



Conception, synthèse et évaluation de nouveaux inhibiteurs du transport de céramide : vers de nouveaux agents de sensibilisation des cellules cancéreuses chimiorésistantes

Cecile Santos

► To cite this version:

Cecile Santos. Conception, synthèse et évaluation de nouveaux inhibiteurs du transport de céramide : vers de nouveaux agents de sensibilisation des cellules cancéreuses chimiorésistantes. Chimie thérapeutique. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2015. Français. NNT : 2015TOU30238 . tel-01388348

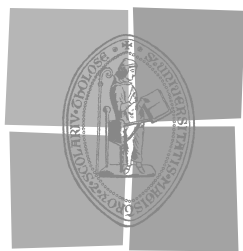
HAL Id: tel-01388348

<https://theses.hal.science/tel-01388348>

Submitted on 26 Oct 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Cécile SANTOS

Le Lundi 30 novembre 2015

Titre :

Conception, synthèse et évaluation de nouveaux inhibiteurs du transport de
céramide : vers de nouveaux agents de sensibilisation des cellules cancéreuses
chimiorésistantes

ED SDM : Chimie, Biologie, Santé - CO 042

Unité de recherche :

UMR 5068 - Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie des Molécules d'Intérêt Biologique

Directeurs de Thèse :

M. Yves Génisson
Mme. Stéphanie Ballereau

Directeur de recherche CNRS, Université Paul Sabatier
Chargée de recherche CNRS, Université Paul Sabatier

Rapporteurs :

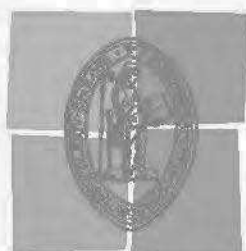
M. Philippe Compain
M. Marcel Hibert

Professeur, Université de Strasbourg
Professeur, Université de Strasbourg

Autres membres du jury :

M. Laurent Maveyraud
M. Jean-Marie Galano
M. Gilbert Lassalle

Professeur, Université Paul Sabatier
Chargé de recherche CNRS, Université de Montpellier
Docteur, Chef du département Chimie Evotec France, Toulouse



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Cécile SANTOS

Le Lundi 30 novembre 2015

Titre :

Conception, synthèse et évaluation de nouveaux inhibiteurs du transport de
céramide : vers de nouveaux agents de sensibilisation des cellules cancéreuses
chimiorésistantes

ED SDM : Chimie, Biologie, Santé - CO 042

Unité de recherche :

UMR 5068 - Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie des Molécules d'Intérêt Biologique

Directeurs de Thèse :

M. Yves Génisson
Mme. Stéphanie Ballereau

Directeur de recherche CNRS, Université Paul Sabatier
Chargée de recherche CNRS, Université Paul Sabatier

Rapporteurs :

M. Philippe Compain
M. Marcel Hibert

Professeur, Université de Strasbourg
Professeur, Université de Strasbourg

Autres membres du jury :

M. Laurent Maveyraud
M. Jean-Marie Galano
M. Gilbert Lassalle

Professeur, Université Paul Sabatier
Chargé de recherche CNRS, Université de Montpellier
Docteur, Chef du département Chimie Evotec France, Toulouse

Remerciements

J'ai accompli ce travail de thèse au Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie des Molécules d'Intérêt Biologique de l'Université PAUL SABATIER. Merci ainsi au Docteur Michel BALTAS, directeur du laboratoire, pour la qualité de son accueil et ses encouragements.

Les Professeurs Philippe COMPAIN et Marcel HIBERT m'ont fait l'honneur d'accepter de lire ce manuscrit et de juger mes travaux en tant que rapporteurs. Je leur exprime ma profonde gratitude et mes sincères remerciements pour leurs remarques constructives. Je tiens aussi à remercier le Professeur Laurent MAVEYRAUD et les Docteurs Jean-Marie GALANO et Gilbert LASSALLE d'avoir accepté avec plaisir de participer au jury et manifesté de l'intérêt à l'égard de ce travail.

Un très grand merci à mes directeurs de thèse, les Docteurs Yves GÉNISSON et Stéphanie BALLEREAU, qui m'ont guidée et poussée à me dépasser pendant ces trois années. Yves, « Monsieur le Directeur », merci pour tes conseils et nos discussions scientifiques, ton exigence, ta réactivité, ta confiance et ton humour. J'ai apprécié de travailler avec toi, que ce soit au laboratoire ou au bureau régional de la Société Chimique de France. Stef, « ma chef », merci pour ton soutien quotidien, ta bonne humeur, tes encouragements, ta rigueur, ton écoute et ton amitié. J'ai beaucoup appris à tes côtés et grâce à toi, j'ai pu m'affirmer.

Je tiens aussi à remercier le Docteur Frédéric RODRIGUEZ, qui m'a initiée et donnée goût à la modélisation. Merci de ta gentillesse, ta disponibilité et ton accueil dans ta petite bulle. Je n'oublierai jamais nos longues discussions pendant les calculs et les pauses café du premier étage avec Christian, Pascal, Christophe, Chantal et Cyril.

Merci également aux Docteurs Corinne PAYRASTRE et Jean-Marc ESCUDIÉ pour notre collaboration dans la bonne humeur sur la « blue jaspine » et votre soutien.

Je remercie l'ensemble des personnes qui m'ont accordée de leur temps pour ma thèse, et plus particulièrement, les Docteurs Chantal GALAUP, Stéphanie COMBEMALE, Christiane ANDRÉ-BARRÈS et Isabelle FABING.

Plusieurs collaborations ont permis l'aboutissement de ce travail. Mes remerciements vont à Virginie GARCIA et au Professeur Thierry LEVADE du CENTRE DE RECHERCHE EN CANCEROLOGIE DE TOULOUSE, ainsi qu'au Professeur Antonio BURTOLOSO et toute son équipe de l'Université de SÃO PAULO pour leur accueil chaleureux dans leur laboratoire. J'exprime aussi mes remerciements aux autres collaborateurs : les Docteurs Laurence FLEURY et Frédéric AUSSEIL de l'unité de PHARMACOCHEMIE DE LA REGULATION EPIGENETIQUE DU CANCER (ETac) du CNRS/Pierre Fabre, le Docteur Dušan BERKEŠ de l'UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE SLOVAQUE DE BRATISLAVA et les Professeurs Adam DAĬCH de l'Université du HAVRE et Philippe COMPAIN de L'UNIVERSITE DE STRASBOURG. Sans eux, ce travail n'aurait pas été aussi riche et varié.

Mes remerciements s'adressent également à l'ensemble des personnes que j'ai eu le plaisir de rencontrer et qui ont contribué directement ou indirectement à l'accomplissement de ce travail. Merci à l'ensemble du troisième étage, avec les sourires et les mots bienveillants de chacun échangés dans les couloirs ou en salle des spectromètres. Chantal, mes après-midi à 'laver-sécher-remplir-

essuyer-mesurer-vider-...' m'ont parues moins longues et bien plus agréables grâce à nos conversations.

Merci à Cécile, Frédéric, Hafida, Christiane, Joëlle, Florence et Corinne qui ont partagés mon quotidien au second étage dans une ambiance joviale. Je vous remercie pour ces moments conviviaux et les pauses café du matin. Merci à Emiliano et Dymytrii pour votre vision optimiste de la chimie...

Un grand merci à mes copines du « Club Tupperware » : Tessa, ton bureau a été toujours ouvert en cas de craquage ; Anne, Khouloud, Kelly, Morgane et Marion (*alias* Chats-Licornes), Maroua, Meire, ..., toujours présentes pour remonter le moral.

Je remercie sincèrement mes confidentes, Alison et tes mots touchants, Béa et ta persévérance exemplaire, et ma petite Claudia... Les filles, surtout ne changez pas. Je m'excuse pour ceux que je n'aurais pas cité, mais merci à tous le LSPCMIB!!!

Je voudrais aussi remercier l'ensemble de mes proches qui m'ont soutenue ; notamment Pitchou, Alice et Aurélia pour vos Loulou'napping parisiens. Merci à Lucie, ma meilleure amie, qui a su accepter mes absences.

Un grand merci à ma sœur, Didi, qui a su me faire oublier tous mes malheurs en quelques secondes avec ses bêtises et nos fous rires ; et à Papa et Maman pour votre soutien sans faille et votre présence rassurante. Votre petite fourmi continue d'avancer...

Enfin, un merci tout particulier à Florian, pour ta patience, ton écoute et ta compréhension, tes attentions, ton affection et tout ce que tu es pour moi.

Sommaire

Remerciements.....	3
Sommaire.....	5
Abréviations et acronymes	9
Introduction générale	15

Chapitre I – Céramide et cancer

I. Le céramide : son métabolisme, ses fonctions et son implication dans le cancer.....	21
1) Introduction.....	21
2) Métabolisme et compartimentation cellulaire	22
a) Structure des sphingolipides	22
b) Métabolisme du céramide et localisation subcellulaire des métabolites.....	22
3) La régulation du céramide et sa fonction de messenger secondaire.....	25
4) L'implication du céramide dans le cancer et les stratégies thérapeutiques associées.....	27
a) Production de céramide	27
b) Blocage des voies métaboliques des sphingolipides.....	27
II. La protéine de transfert de céramide CERT	33
1) Une cible pertinente dans une stratégie anti-tumorale.....	33
2) Structure et fonctionnement de la protéine	34
a) Le motif FFAT.....	34
b) Le domaine PH.....	34
c) Le domaine START	35
d) Le fonctionnement de la protéine.....	35
3) Inhibiteurs connus du transport de céramide par CERT	36
III. Conclusion	37
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	38

Chapitre II – Méthodologie d'identification d'antagonistes potentiels de la protéine CERT

I. Modélisation moléculaire.....	47
1) Etude structurale.....	47
a) Collection de structures	47
b) Alignement des structures et classification.....	48
c) Conclusion intermédiaire	52

2)	Arrimage moléculaire	53
a)	Le processus d'arrimage moléculaire protéine-ligand	53
b)	Choix des structures	56
c)	Définition du site de liaison et des contraintes de calculs	57
d)	Analyse des résultats post-docking	58
3)	Validation préliminaire du modèle <i>in silico</i>	59
II.	Tests de reconnaissance avec CERT	64
1)	Etat de l'art	64
a)	Tests <i>ex vivo</i>	64
b)	Tests <i>in vitro</i>	67
2)	Test de liaison spécifique optimisé	71
3)	Conclusion intermédiaire	87
III.	Méthode d'identification de nouveaux ligands.....	88
1)	Corrélation <i>in silico</i> & <i>in vitro</i>	88
2)	Limites et optimisation de la méthode	90
3)	Validation de la méthode	92
IV.	Recherche de nouveaux antagonistes potentiels de CERT	104
1)	Criblage.....	104
a)	Application du filtre <i>in silico</i>	104
b)	Criblage haut-débit <i>in vitro</i>	114
2)	Conception rationnelle <i>in silico</i> et relation structure-activité	131
a)	Famille des HPAs	131
b)	Iminosucres	136
V.	Conclusion.....	145
	PARTIE EXPÉRIMENTALE	146
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	149

Chapitre III – Jaspine B et dérivés de la Jaspine B

I.	Activité de la jaspine B et analogues.....	155
1)	La jaspine B et mécanisme moléculaire	155
2)	Relations structure-activité de la jaspine	158
a)	Stéréochimie du cycle	158
b)	Bioisostères de la jaspine B	158
c)	Modifications de la chaîne	159

3)	Conclusion préliminaire sur l'activité de la jaspine et hypothèses de travail	160
II.	Synthèses de la jaspine B.....	161
1)	Synthèses de la jaspine B à partir d'un précurseur chiral	162
a)	A partir de phytosphingosine	162
b)	A partir de la L-sérine	164
c)	A partir de l'acide tartrique	168
d)	A partir de carbohydrates et dérivés carbohydrates	169
2)	Synthèses asymétriques de la jaspine B à partir de molécules simples.....	176
III.	Nouvelle voie d'accès à la jaspine B.....	183
IV.	Synthèse de sondes fluorescentes de la jaspine B : vers une compréhension de son mode d'action.....	191
1)	Synthèse à partir de l'oxazolidinone vinylique (210)	191
2)	Synthèse à partir de l'oxazolidinone lactone (214).....	195
3)	Imagerie de fluorescence	200
V.	Conclusion.....	201
	PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	202
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	221

Chapitre IV – Synthèse d'iminosucres

I.	Introduction.....	229
II.	Synthèse du ligand L127.....	229
1)	Stratégie de synthèse	229
2)	Synthèse du composé.....	230
a)	Formation de la (Z)-diazocétone α,β -insaturée	230
b)	Formation de la dihydropyridinone	232
c)	Fonctionnalisation	232
III.	Synthèse du ligand L125.....	234
1)	Première voie de synthèse	234
a)	Protection des <i>trans</i> -diols vicinaux de la trihydroxypipéridine (257a)	234
b)	Protection des <i>trans</i> -diols vicinaux des trihydroxypipéridines (258) et (264)	235
c)	Calculs DFT.....	237
2)	Deuxième voie de synthèse.....	241
3)	Troisième voie de synthèse	246
4)	Dédoublage du mélange racémique.....	247

IV.	Conclusions et perspectives.....	248
1)	Conclusions.....	248
2)	Perspectives.....	250
	PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	252
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	265
	Conclusion générale.....	269

Abréviations et acronymes

μ: micro

A

AcO: acétate

Ala: alanine

APTS: acide *p*-toluènesulfonique

Arg: arginine

ARN: acide ribonucléique

Asn: asparagine

ATP: adénosine triphosphate

B

BBA: butane-2,3-bisacétal

bis-DHP: 3,3',4,4'-tétra-hydro-6,6'-spirobi-2*H*-pyrane

Bn: benzyle

Boc: *tert*-butoxycarbonyle

BODIPY: 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène

BTSH: 2-mercaptobenzothiazole

Bz: benzoyle

C

C1P: céramide-1-phosphate

C1PP: céramide-1-phosphate phosphatase

CAN: Nitrate de cérium et d'ammonium

Cbz: carboxybenzyle

CDase: céramidase

Cdk: kinase cycline dépendante

Cer : céramide

CERK: céramide kinase

CerS: céramide synthase

Cl₅₀: concentration inhibitrice médiane

CK: caséine kinase

CPE: céramide phosphoéthanolamine

CSA: acide camphresulfonique

CSO: camphorsulfonyloxaziridine

D

DACH: 1,2-diaminocyclohexane

DAG (ou DDR): diacylglycérol

DBU: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène

DCM (ou CH₂Cl₂): dichlorométhane

DDQ: 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DDR: C10-diacylglycérol
DES: désaturase
DET: diéthyl tartrate
DFT: « density functional theory », théorie de la fonction de densité
DGJ: déoxygalactonojirimycine
dhCer: dihydrocéramide
(DHQ)₂PHAL: hydroquinine 1,4-phthalazinediyl-diéther
(DHQ)₂PYR: hydroquinine 2,5-diphényl-4,6-pyrimidinediyl-diéther
DIBAL: hydrure de diisobutylaluminium
DIPEA: *N,N*-diisopropyléthylamine
DIX: didéoxyiminoxylitol
DMAP: 4-diméthylaminopyridine
DMB: diméthyl-BODIPY
DMF: *N,N*-diméthylformamide
DMP: périodine de Dess-Martin
DMPU: 1,3-diméthyl-3,4,5,6-tetrahydro-2(1*H*)-pyrimidinone
DMS: diméthylsphingosine
DMSO: diméthylsulfoxyde
DNJ: déoxynojoirimecine

E

ERK: kinase régulée par un signal extracellulaire
ESI: ionisation par électrospray
Et₂O: diéthyléther
Et₃N: triéthylamine
EtOAc: acétate d'éthyle
EtOH: éthanol

F

FAPP2: « phosphoinositol 4-phosphate adaptor protein-2 »
FLINT: "fluorescence intensity", intensité de fluorescence
Fmoc: fluorénylméthylcarbamate
FRET: fluorescence par transfert d'énergie de résonance

G

GalCer: galactocéramide
GCase: glucocérobrosidase
GCS: glucosylcéramide synthase
GlcCer: glucosylcéramide
Gln: glutamine
Glu: glutamate
GSL: glycosphingolipide

H

HA: « heavy atoms », nombre d'atomes lourds

HBSS: solution saline équilibrée de Hank

His: histidine

HMDS: hexaméthylidisilazane ou *bis*(triméthylsilyl)amine

HPA: *N*-(3-hydroxy-1-hydrométhyl-3-phénylpropyl)alcanamide

HPLC: chromatographie liquide haute performance

HRMS: spectrométrie de masse haute résolution

HWE: Horner-Wadworth-Emmons

I

IBX: acide 2-iodobenzoïque

Ile: isoleucine

L

LacCer: lactosylcéramide

LAH: tétrahydruroaluminate de lithium

LC/MS: chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

LDA: lithium diisopropylamide

LE: « ligand efficiency »

Leu: leucine

Lys: lysine

M

MAM: membranes associées à la mitochondrie

MAPK: «mitogen-activated protein kinase»

m-CPBA: acide *m*-chloroperbenzoïque

MeCN: acétonitrile

MeOH: méthanol

MOM: méthoxyméthyle

MOMP: perméabilisation des membranes externes de la mitochondrie

Ms: mésyle

MS: spectrométrie de masse

N

NBD: nitrobenzofurane

NBS: *N*-bromosuccinimide

NCS: *N*-chlorosuccinimide

P

PC: phosphatidylcholine

PCC: chlorochromate de pyridinium

PCM : « polarizable continuum model », modèle continuum polarisable

PDB: « protein data bank »

PE: éther de pétrole

Phe: phénylalanine

PhytoCer: phytocéramide

PK: protéine kinase

PMB: para-méthoxybenzyle

PP: protéine phosphatase

Pro: proline

R

RB: rétinoblastome

RCA: ricinus communis agglutinin

RE: réticulum endoplasmique

RMN: résonance magnétique nucléaire

RMSD: « Root-Mean-Square Deviation »

S

S1P: sphingosine-1-phosphate

S1PP: sphingosine-1-phosphate phosphatase

Ser: sérine

SFC : fluide super-critique

SK: sphingosine kinase

SL: sphingolipide

SM: sphingomyéline

SMase: sphingomyélinase

SMS: sphingomyéline synthase

Sph: sphingosine

SPR: résonance plasmonique de surface

SPT: sérine palmitoyltransférase

SR: « serine rich », riche en sérine

SVF: sérum de veau fœtal

T

TA : température ambiante

TBAF: fluorure de tétra-*n*-butylammonium

TBDMS (ou TBS): *tert*-butyldiméthylsilyle

TEMPO: 2,2,6,6-tétraméthylpipéridine 1-oxyl

Tf: triflate

TFA: acide trifluoroacétique

THF: tétrahydrofurane

Thr: thréonine

TIPS: triisopropylsilyle

TLC: « thin layer chromatographie », chromatographie sur couche mince

TMB: 2,2,3,3-tétraméthoxybutane

TMC: 1,1,2,2-tétraméthoxycyclohexane

TMOA: triméthylorthoacétate

Tr: trityle

Trp: tryptophane

Ts: tosyle

Tyr: tyrosine

U

UV: ultraviolet

V

Val: valine

Introduction générale

Introduction générale

Les sphingolipides sont des lipides bioactifs complexes présents dans les membranes plasmiques des cellules eucaryotes. De par leur fonction physiologique, ce sont des constituants structuraux essentiels au fonctionnement de ces cellules. Ils sont aussi impliqués dans la transduction du signal et la régulation de nombreux événements cellulaires, tels que l'inflammation, la différenciation, la prolifération, l'adhésion, la migration, la sénescence ou l'apoptose.

Un réseau de voies enzymatiques interdépendantes régule les effets proapoptotiques (céramide et sphingosine) et les effets prolifératifs (glucosylcéramide et sphingosine-1-phosphate) des sphingolipides au sein des différents compartiments cellulaires. Le céramide occupe un rôle central dans ce métabolisme. Il est le précurseur de tous les sphingolipides complexes. La régulation de sa biosynthèse et de sa bioconversion en sphingolipides complexes est un processus clé dans l'homéostasie des sphingolipides.

Dans les cellules cancéreuses, la balance entre les sphingolipides proapoptotiques et prolifératifs est perturbée en faveur des sphingolipides prolifératifs. Ce déséquilibre implique une diminution du taux intracellulaire en céramide proapoptotique en raison de sa conversion accrue en glucosylcéramide et sphingomyéline. La correction de ce déséquilibre par modulation pharmacologique du métabolisme des sphingolipides a émergé comme stratégie anticancéreuse au cours des dernières années. Le Chapitre 1 présente ainsi le métabolisme des sphingolipides, leur implication dans le cancer et les différentes modulations pharmacologiques possibles dans une démarche thérapeutique contre le cancer.

L'une des stratégies adoptée au laboratoire pour rétablir une concentration intracellulaire significative en céramide est de bloquer sa conversion en sphingomyéline. Le céramide synthétisé *de novo* au niveau du réticulum endoplasmique est transporté jusqu'à l'appareil de Golgi par une protéine cytosolique CERT (« CERamide Transfert »), où il est converti en sphingomyéline par la sphingomyéline synthase. L'inhibition de la protéine de transport CERT permet de resensibiliser les cellules cancéreuses résistantes aux agents chimiothérapeutiques. Malgré la pertinence de cette cible, une seule famille d'inhibiteur est connue à ce jour : les HPAs. De plus, depuis leur découverte en 2001, aucune optimisation structurale n'a été décrite. Ainsi, ces travaux de thèse ont visés à identifier de nouveaux inhibiteurs potentiels du transport de céramide par CERT en tant qu'agents de resensibilisation de lignées de cellules cancéreuses chimiorésistantes.

Parmi les trois sous-domaines de la protéine CERT, le domaine C-terminal START (« STeroidogenic Acute Regulatory protein-related lipid Transfer ») transférant spécifiquement le D-erythro-céramide est responsable de l'activité de transport de la protéine. A partir des structures cristallographiques disponibles du domaine START de CERT sous sa forme *apo* ou co-cristallisé avec des céramides ou HPAs, le Chapitre II présente une méthode d'identification rationnelle de nouveaux ligands du domaine START de CERT comme antagonistes potentiels de la protéine, en combinant des outils *in silico* et *in vitro*. Ces travaux ont donné lieu à plusieurs collaborations avec le Pr. Thierry Levade (Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse, CRCT) pour l'évaluation biologique des ligands ; ainsi qu'avec les Pr. Adam Daïch (Unité de Recherche en Chimie Organique et Macromoléculaire,

EA3221, FR CNRS 3038, Université du Havre, France) et le Dr. Dušan Berkeš (Département de Chimie Organique de l'Université de Technologie Slovaque, Bratislava, Slovaquie) pour l'étude d'analogues HPAs et le Pr. Philippe Compain (Laboratoire de Synthèse Organique et Molécules Bioactives, Université de Strasbourg) pour l'étude d'analogues iminosucres, en tant que mimes du céramide.

Les synthèses multi-étapes d'une partie des ligands identifiés par cette méthode sont présentées dans les chapitres suivants. Le Chapitre III présente la synthèse et l'évaluation biologique de la jaspine B, un inhibiteur de la sphingomyéline synthase connu au laboratoire, ainsi que le développement de sondes dérivées de la jaspine B afin d'approfondir la compréhension du mode d'action de cette dernière par imagerie de fluorescence.

Enfin, le chapitre IV présente la synthèse de deux iminosucres de type pipéridines trihydroxylées *N*-et/ou *O*-alkylées également identifiés comme ligands potentiels du domaine START de CERT. Une partie de ces synthèses a été réalisée pendant un séjour de trois mois au Brésil, au sein du laboratoire du Pr. Antonio Burtoloso (Institut de Chimie de São Carlos, Université de São Paulo, Brésil).

Chapitre I – Céramide et cancer

I.	Le céramide : son métabolisme, ses fonctions et son implication dans le cancer.....	21
1)	Introduction.....	21
2)	Métabolisme et compartimentation cellulaire	22
a)	Structure des sphingolipides	22
b)	Métabolisme du céramide et localisation subcellulaire des métabolites.....	22
3)	La régulation du céramide et sa fonction de messenger secondaire.....	26
4)	L'implication du céramide dans le cancer et les stratégies thérapeutiques associées.....	28
a)	Production de céramide	28
b)	Blocage des voies métaboliques des sphingolipides.....	28
II.	La protéine de transfert de céramide CERT	35
1)	Une cible pertinente dans une stratégie anti-tumorale.....	35
2)	Structure et fonctionnement de la protéine	35
a)	Le motif FFAT.....	35
b)	Le domaine PH.....	36
c)	Le domaine START	36
d)	Le fonctionnement de la protéine.....	36
3)	Inhibiteurs connus du transport de céramide par CERT	38
III.	Conclusion	38
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	40

I. Le céramide : son métabolisme, ses fonctions et son implication dans le cancer

1) Introduction

Les lipides sont les constituants principaux des membranes cellulaires, qui agissent comme barrière physique et régulent divers processus cellulaires. Dans les cellules mammifères, on retrouve trois catégories de lipides membranaires classées selon leurs structures chimiques : les glycérolipides (constitués d'un squelette glycérol acylé), les stérols, et les sphingolipides (SLs) (constitués d'un squelette sphingoïde). Cette dernière classe de lipides est le constituant majoritaire des membranes plasmiques eucaryotes.

Depuis leur découverte à la fin du XIX^{ème} siècle, les SLs se sont révélés indispensables au développement de ces organismes de par leur fonction physiologique, puis plus récemment, de par leur implication dans la transduction du signal et la régulation de plusieurs fonctions cellulaires telles que la prolifération, la différenciation, l'adhésion, la migration, la sénescence, l'apoptose et l'inflammation. En tant que lipides bioactifs, les SLs sont impliqués dans le développement de différentes pathologies. La modulation de leur métabolisme est donc apparue comme une approche thérapeutique pertinente dans le contexte des maladies neurodégénératives,¹⁻⁴ du diabète,^{5, 6} des désordres inflammatoires,^{4, 7} de syndromes d'immunodéficience,⁴ et du cancer.^{3, 4, 8-12} ENREF 3

Parmi ces sphingolipides bioactifs, le céramide (Cer) occupe un rôle central dans le métabolisme des SLs. Il est le précurseur et le squelette de base de tous les SLs complexes. Sa production et sa transformation sont des processus clés dans la régulation des taux de SLs en réponse à un stimuli cellulaire, tel que le signal pro-apoptotique induit par un agent anti-cancéreux par exemple.¹³

Dans ce chapitre, nous présenterons brièvement le métabolisme des SLs et plus particulièrement les voies de biosynthèse et de bioconversion du Cer ainsi que leur localisation subcellulaire. Nous aborderons ensuite les fonctions du Cer, son implication dans le cancer et les cibles possibles de son métabolisme dans le cadre d'une stratégie anti-tumorale. Dans un second temps, nous présenterons plus en détails la protéine CERT, l'une des cibles possibles choisie dans notre stratégie anti-tumorale ciblant les cellules cancéreuses multi-résistantes aux agents chimiothérapeutiques.

2) Métabolisme et compartimentation cellulaire

a) Structure des sphingolipides

Le Cer est composé d'un squelette sphingosine (18 atomes de carbone) lié à une chaîne acyle (de 14 à 26 atomes de carbone) par un lien amide. Les SLs complexes sont formés à partir du Cer par introduction d'un groupement polaire sur la fonction alcool primaire en position C1 du Cer. La nature de la tête polaire définit la classe de SL. Ainsi, l'introduction d'un groupement phosphate, phosphocholine, galactose ou glucose donne respectivement le céramide-1-phosphate (C1P), la sphingomyéline (SM), le galactocéramide (GalCer) et le glucosylcéramide (GlcCer).

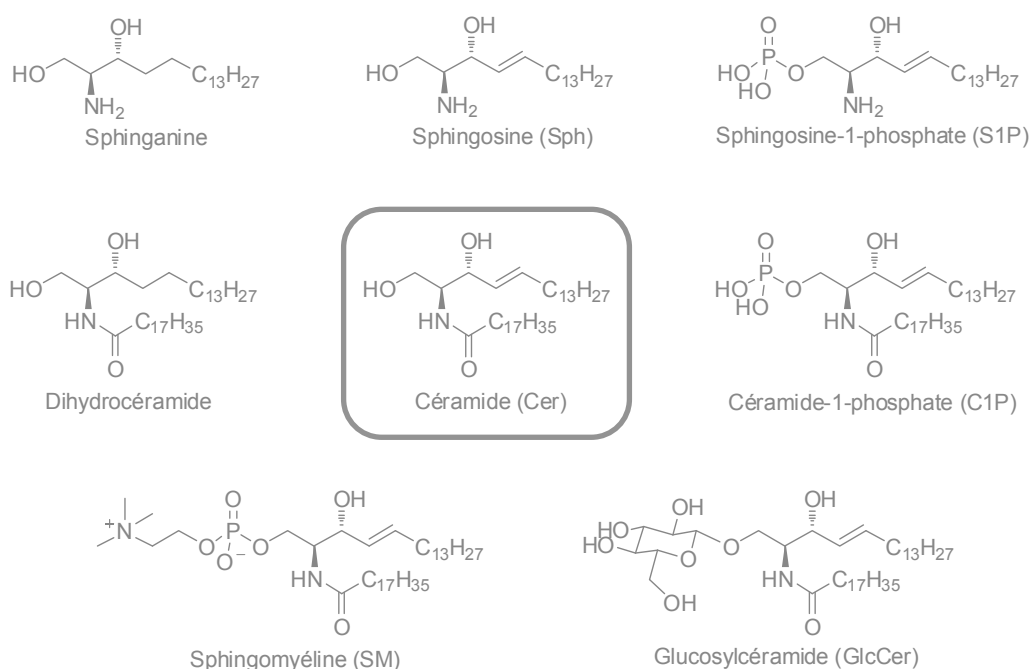


Figure 1 - Structure des principaux sphingolipides

b) Métabolisme du céramide et localisation subcellulaire des métabolites

Le Cer peut être généré par trois voies différentes, impliquant de nombreuses enzymes et différentes réactions métaboliques.

La première voie représente le point d'entrée du métabolisme des SLs (cf. Schéma 1 en bleu et Figure 2). Le Cer est synthétisé *de novo*¹⁴ au niveau de la face cytosolique du réticulum endoplasmique (RE). La sérine palmitoyltransférase (SPT) y catalyse la condensation de la L-sérine et du palmitoyl-CoA pour donner la 3-cétosphinganine.¹⁵ La 3-cétosphinganine est ensuite réduite en sphinganine (ou dihydrosphingosine) par la 3-cétosphinganine réductase. Six formes de dihydrocéramides synthases (dhCerS1-6), aussi appelées céramides synthases (CerS1-6), permettent la *N*-acylation de la sphinganine par des chaînes grasses de longueur différente.¹⁶ Les dihydrocéramides obtenus sont désaturés, c'est-à-dire qu'une double liaison est formée entre les atomes de carbone en positions 4 et 5 par la dihydrocéramide désaturase (DES), pour aboutir à des céramides possédant différentes

longueurs de chaîne acyle. Le terme générique « céramide » (noté Cer) désigne alors l'ensemble des céramides de longueurs de chaîne différentes.

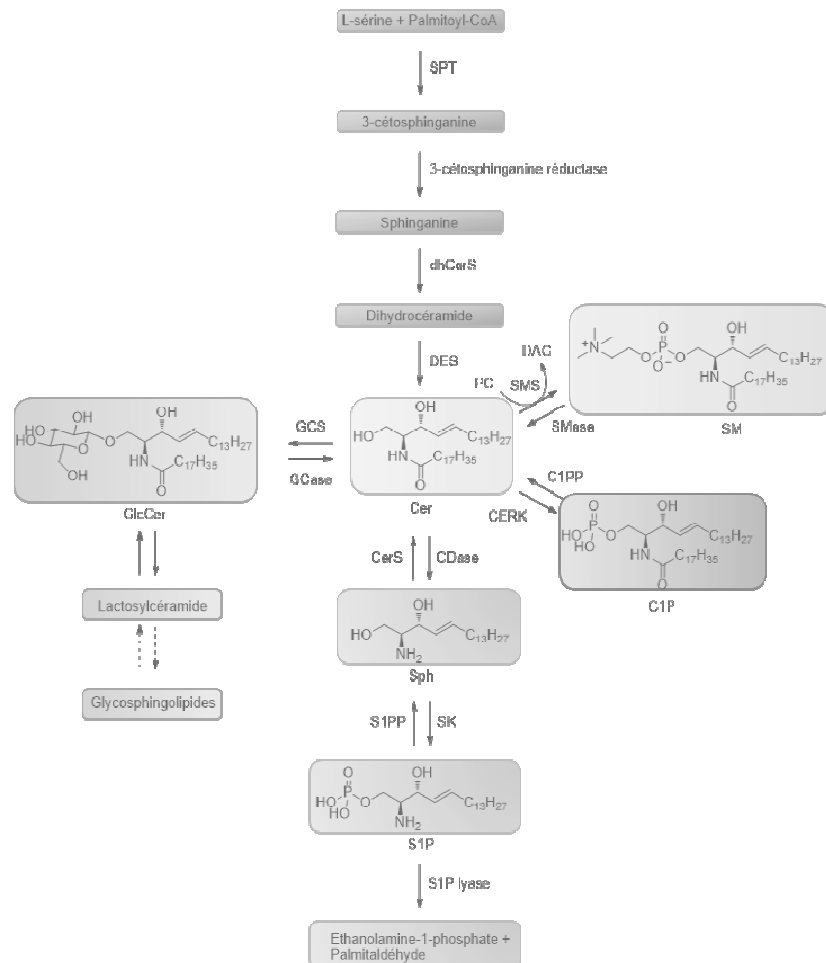


Schéma 1 - Métabolisme des sphingolipides. C1P : céramide-1-phosphate, C1PP : céramide-1-phosphate phosphatase, CDase : céramidase, Cer : céramide, CERK : céramide kinase, CerS : céramide synthase, DAG : diacylglycérol, DES : dihydrocéramide désaturase, dhCerS : dihydrocéramide synthase, GCase : glucocérébrosidase, GCS : glucosylcéramide synthase, GlcCer : glucosylcéramide, PC : phosphatidylcholine, S1P : sphingosine-1-phosphate, S1P lyase : sphingosine-1-phosphate lyase, S1PP : sphingosine-1-phosphate phosphatase, SK : sphingosine kinase, SM : sphingomyéline, SMase : sphingomyélinase, SMS : sphingomyéline synthase, Sph : sphingosine, SPT : sérine palmitoyl transférase.

La deuxième grande voie de synthèse du Cer réside dans le catabolisme de SLs complexes tels que le GlcCer, la SM, et le C1P par leur enzyme de dégradation respective, sphingomyélinase (SMase), β -glucocérébrosidase et céramide-1-phosphate phosphatase (C1PP). Ces trois SLs complexes sont produits au niveau de l'appareil de Golgi à partir du Cer synthétisé *de novo* dans le RE mais, suite à leur distribution intracellulaire, leur dégradation en Cer intervient au sein de divers compartiments tels que la membrane plasmique et le lysosome, mais aussi la mitochondrie. Nous détaillerons chacune de ces trois voies spécifiques à partir de chaque métabolite du Cer.

- *Via le glucosylcéramide* : Le Cer, insoluble dans le cytosol, peut être transporté du RE vers la face cytosolique de l'appareil de Golgi par des vésicules membranaires. La glucosylcéramide synthase (GCS) catalyse la glycosylation de l'alcool primaire du Cer pour fournir le GlcCer. Ensuite, la protéine FAPP2 (« four-phosphate adaptor ») transporte de façon non vésiculaire le GlcCer de son site de synthèse au compartiment distal de l'appareil de Golgi, contrôlant la synthèse des glycosphingolipides (GSLs). Les GSLs néosynthétisés sont alors acheminés jusqu'à la membrane

plasmique par voie vésiculaire et se catabolisent principalement après endocytose de la membrane plasmique au sein des endosomes et des lysosomes par dégradation séquentielle en Cer par la β -glucocérébrosidase (cf. Schéma 1 et Figure 2 en rose).²

- *Via la sphingomyéline* : Le Cer synthétisé *de novo* peut aussi être transporté vers l'appareil de Golgi par la protéine cytosolique de transport de Cer, CERT.¹⁷ Cette voie de transport est spécifique à la conversion du Cer en SM. La sphingomyéline synthase (SMS) catalyse ainsi le transfert d'un groupement phosphorylcholine sur le Cer à partir de la phosphatidylcholine (PC) pour donner la SM et le diacylglycérol (DAG). Il existe deux isoformes de la SMS : la SMS1, qui est localisée sur la face luminale de l'appareil de Golgi, et la SMS2, qui est principalement localisée au niveau de la membrane plasmique. Une enzyme apparentée, la SMSr (« SMS-related protein »), a récemment été décrite comme convertissant le Cer en Cer-phosphoéthanolamine (CPE). Son niveau basal d'activité est faible et elle interviendrait essentiellement pour limiter un excès intracellulaire en Cer en supprimant la signalisation apoptotique de ce dernier.¹⁸ La SM synthétisée dans l'appareil de Golgi est ensuite transportée vers la membrane plasmique par des vésicules membranaires, puis par endocytose vers le lysosome. Plusieurs sphingomyélinase (SMase), incluant les SMases acide (A-SMase), neutres (N-SMase) et basique (B-SMase), hydrolysent la SM au niveau de la membrane plasmique et du lysosome pour fournir le Cer (cf. Schéma 1 et Figure 2 en turquoise).^{19, 20}

- *Via le céramide-1-phosphate* : Le Cer issu de l'hydrolyse de la SM peut à son tour être phosphorylé par la céramide kinase (CERK)²¹ pour fournir le C1P de façon réversible. Le C1P peut alors être déphosphorylé par la C1P phosphatase (C1PP) pour régénérer le Cer (cf. Schéma 1 en violet).²²

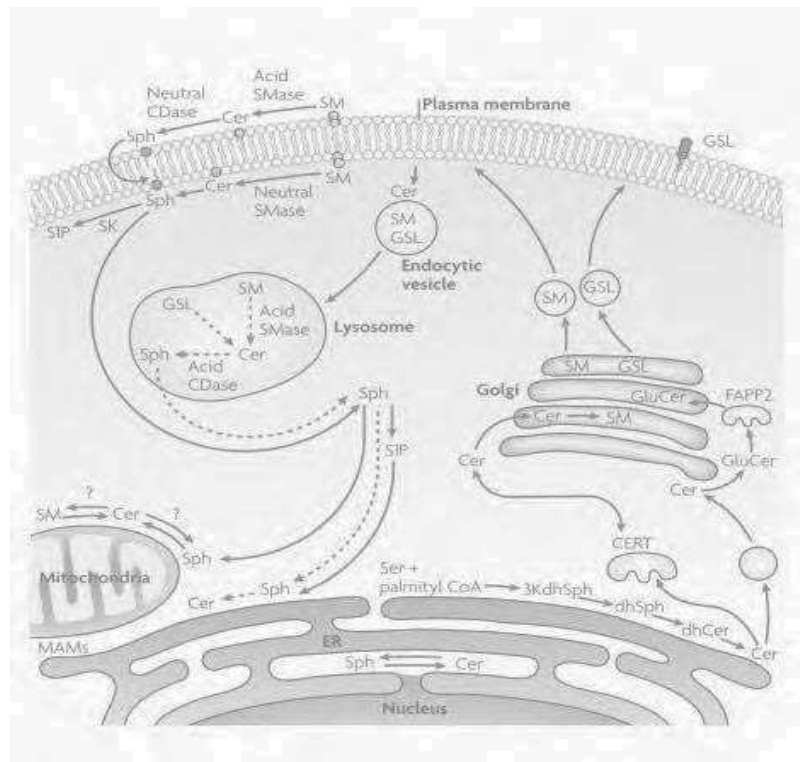


Figure 2 - Compartimentation des métabolites et des enzymes du métabolisme des sphingolipides, adapté de Hannun et Obeid, *Nature Reviews, Mol. Cell. Biol.*, 2008, 9, 139-150.²³ 3KdhSph : 3-cétodihydrosphingosine ou 3-cétosphinganine, CDase : céramidase, Cer : céramide, CERT : céramide transfert protéine, dhCer : dihydrocéramide, dhSph : dihydrosphingosine ou sphinganine, FAPP2 : phosphoinositol 4-phosphate adaptor protein-2, GlcCer : glucosylcéramide, GSL : glycosphingolipides, MAM : membranes associées à la mitochondrie, S1P : sphingosine-1-phosphate, Ser : sérine, SM : sphingomyéline, SMase : sphingomyélinase, Sph : sphingosine.

Enfin, la dernière voie de synthèse du Cer est appelée voie de recyclage (« salvage pathway ») (cf. Schéma 1 et Figure 2 en orange).²⁴ Cette voie permet de resynthétiser des SLs à partir de la dégradation des SLs complexes ayant lieu principalement au niveau des lysosomes. Ainsi, le Cer produit par catabolisme des SLs complexes est hydrolysé en sphingosine (Sph) par des céramidases acides (CDases). La Sph, libérée du lysosome, peut ensuite suivre deux voies distinctes. Elle peut être recyclée directement en Cer sous l'action des CerS qui acceptent aussi bien comme substrats la dihydrosphingosine (sphinganine) que la Sph. La Sph produite dans le lysosome peut par ailleurs être phosphorylée par des sphingosines kinases (SK1 et SK2) pour fournir la sphingosine-1-phosphate (S1P), un messager agissant au niveau de récepteurs extracellulaires de type RCPG. Une production de S1P *via* le Cer est aussi observée au niveau de la membrane plasmique.²⁵ La S1P peut être déphosphorylée par la S1P phosphatase (S1PP) pour régénérer la Sph au niveau du RE. Alternativement la S1P peut être hydrolysée par la S1P lyase pour générer du palmitaldéhyde et de l'éthanolaminephosphate ; c'est la voie de sortie du métabolisme des SLs.

Bien que l'ensemble de ces voies métaboliques permettent la synthèse du Cer, les deux principales voies de production du Cer sont sa biosynthèse *de novo* et la dégradation de la SM par des SMases. Si la première sert au maintien de l'homéostasie en Cer, la seconde serait mobilisée pour une production rapide de Cer en réponse à un stimulus externe. L'activation d'une voie métabolique (souvent réversible) au profit d'une autre est modulée par l'activation de plusieurs enzymes (près d'une trentaine) pour équilibrer les effets bioactifs de chaque SL et réguler le taux de Cer dans les différents compartiments cellulaires.²³

3) La régulation du céramide et sa fonction de messenger secondaire

L'analyse du métabolisme du Cer met en évidence son rôle central dans le métabolisme des SLs et dans la signalisation cellulaire. De façon générale, différents stimuli régulent et équilibrent le taux intracellulaire en SLs prolifératifs (S1P et GlcCer) et SLs pro-apoptotiques (Sph et Cer). On retrouve classiquement un rapport entre les concentrations intracellulaires en S1P/Sph/Cer/SM de 1 : 100 : 3 000 : 30 000.²³ La variation de ces taux déclenche une réponse cellulaire ciblée. En particulier, l'augmentation de la concentration intracellulaire en Cer est souvent liée à une inhibition de croissance, à la sénescence et à la mort cellulaire.^{3, 8} ENREF 3 Bien qu'il existe plus d'une cinquantaine d'espèces céramides, avec des longueurs de chaînes variables associées à différentes localisations subcellulaires, pouvant chacune entraîner une signalisation différente, voire contradictoire (telle que la prolifération),^{26, 27} seul le rôle de messenger pro-apoptotique du céramide (au sens large) sera abordé dans cette partie.

Sous l'effet de stimuli apoptotiques ou antiprolifératifs, tels que des cytokines, des agents chimiothérapeutiques, des radiations ionisantes ou d'autres stress cellulaires, le taux intracellulaire en Cer est augmenté au niveau de la mitochondrie (hydrolyse de la SM par N-SMase), du réticulum endoplasmique (synthèse *de novo*), du lysosome (hydrolyse des SLs complexes, notamment activation de A-SMase) et des membranes plasmiques (hydrolyse de la SM par A-SMase et N-SMase).⁸ Le Cer ainsi généré transmet ainsi le signal apoptotique en régulant des protéines spécifiques de type phosphatases, kinases et cathepsine D. Les mécanismes de transduction du signal par le Cer sont détaillés dans la Figure 3.

La cathepsine D, une protéase lysosomale, est activée par le Cer pour cliver la protéine pro-apoptotique Bid en tBid (truncated Bid) qui permet la libération de cytochrome c, un facteur mitochondrial pro-apoptotique. Ce dernier active en cascade les caspases conduisant à l'apoptose.⁸

Parmi les cibles de type phosphatases, on retrouve les phosphatases PP1 et PP2A. Le Cer produit au niveau mitochondrial ou membranaire (plasmique ou RE) active, par PP1, la déphosphorylation de la protéine rétinoblastome (protéine RB) et des protéines riches en sérine/arginine (protéines SR), et active PP2A pour déphosphoryler et inactiver les protéines kinase C alpha (PKC α), AKT et Bcl-2 anti-apoptotiques, sous-réguler c-myc et activer le facteur de transcription c-jun.^{8, 28} ENREF 27 La modulation de ces différents substrats par ces phosphatases activées entraîne la libération du cytochrome c menant à l'apoptose par activation en cascade des caspases.

Parmi les kinases ciblées par le Cer, on retrouve la protéine kinase C zéta (PKC ζ) et la kinase suppresseur de Ras (KSR) impliquées dans la cascade MAPKs (mitogen-activated protein kinase-kinase), *via* les kinases JNKs (c-Jun-N-Terminal-kinases), conduisant à l'apoptose. Le Cer peut aussi activer cette cascade par activation préalable de la protéine Rac-1.^{8, 29} ENREF 28

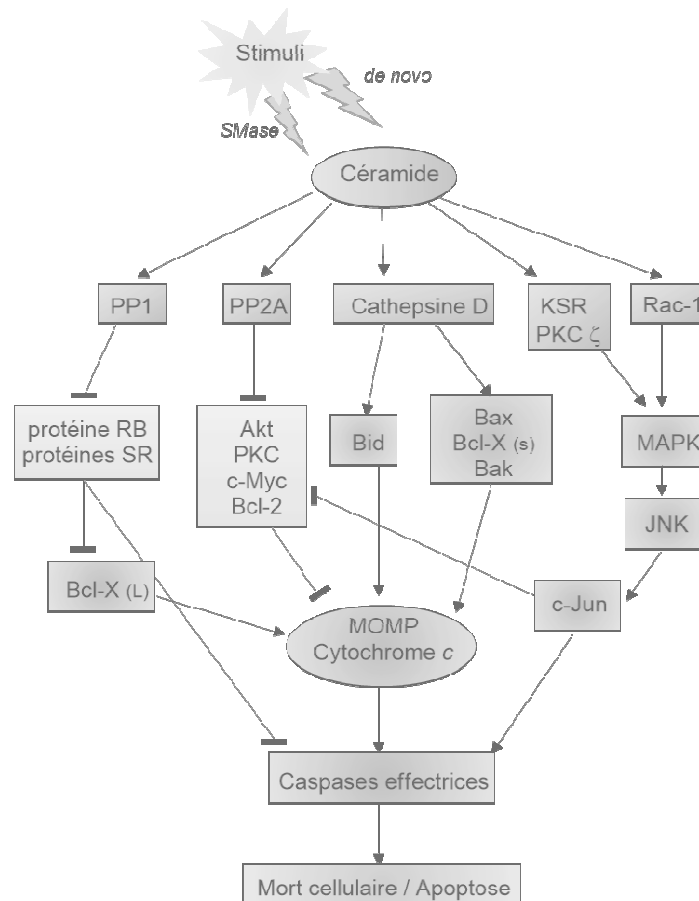


Figure 3 - Voies de transduction du signal par le céramide, adapté de T. H. Beckham and coll. *Adv. Cancer Res.* 2013, 117, 1-36.³⁰ JNK : c-Jun-N-Terminal-kinases, KSR : kinase suppresseur de Ras, MAPK : mitogen activated protein kinase, MOMP : mitochondrial outer-membrane permeabilisation, PKC : protéine kinase C, PP : protéine phosphatase, RB : rétinoblastome, SR : riche en sérine/arginine.

Ainsi, le Cer, messenger secondaire dans le signal apoptotique, est impliqué dans plusieurs voies de signalisation pro-apoptotique variables selon les compartiments cellulaires. Cette réponse peut être équilibrée par la présence de SLs prolifératifs, notamment la S1P. L'équilibre entre ces SLs messagers détermine donc la survie ou la mort de la cellule.³¹

Cette signalisation pro-apoptotique peut être amplifiée par l'implication du Cer dans les propriétés biophysiques de la membrane plasmique, en influençant notamment la fluidité membranaire. Du fait de la nature compacte de sa tête polaire, le Cer possède en effet la propriété de s'auto-associer fortement au sein de la bicouche lipidique. En revanche, la SM et le GlcCer, SLs à groupements polaires plus volumineux, s'intercalent préférentiellement avec le cholestérol pour former des microdomaines membranaires dynamiques, appelés radeaux lipidiques (« lipid rafts »), représentant des îlots de phase liquide ordonnée au sein d'une phase lipidique plus fluide. La présence de ces radeaux lipidiques conduit à une partition latérale des protéines membranaires jouant un rôle déterminant dans la transduction du signal *via* le recrutement et la concentration locale de récepteurs. La libération rapide de Cer au sein des membranes, entraîne l'agglomération des radeaux lipidiques et des protéines associées au sein de macrodomaines rigides, riches en Cer et appauvri en cholestérol. Ces structures servent alors de plateformes pour l'assemblage et l'activation de récepteurs moléculaires spécifiques (tels que les récepteurs de mort cellulaire par exemple) qui conduisent ainsi à une amplification de signalisation transmembranaire.³²

4) L'implication du céramide dans le cancer et les stratégies thérapeutiques associées

La régulation du métabolisme des SLs, et plus particulièrement la balance entre les SLs pro-apoptotiques ou « suppresseurs de tumeur » et les SLs prolifératifs ou « promoteurs de tumeurs », est décisive dans la prolifération ou la mort cellulaire.

Un déséquilibre entre ces espèces en faveur des SLs promoteurs de tumeur est impliqué dans le comportement atypique des cellules cancéreuses se traduisant par une résistance à l'apoptose et une prolifération accrue. Ce dérèglement correspond à la surexpression de certaines enzymes (GCS, CDases, SK, CERK) et à la sous-régulation d'autres (SMases, S1P lyase, S1PP), conduisant de façon générale à une surconsommation du Cer, souvent liée au caractère de résistance des tumeurs aux thérapies anticancéreuses.³⁰ La stimulation de production de Cer et le blocage de certaines voies métaboliques par intervention pharmacologique représentent ainsi deux stratégies thérapeutiques contre le cancer.

a) Production de céramide

Indépendamment de leur modes d'actions spécifiques, de nombreux agents chimiothérapeutiques, tels que la daunorubicine, la doxorubicine, le paclitaxel, l'étoposide, la camptothécine, la fludarabine et la gemcitabine, permettent de générer du Cer en stimulant la voie de synthèse *de novo* par activation de la SPT et/ou CerS. Certaines de ces drogues sont aussi capables d'activer des SMases pour produire du Cer par hydrolyse de la SM.^{8, 33, 34} Cette approche peut être combinée avec l'inhibition des voies de consommation du Cer afin d'améliorer les résultats de la thérapie dans le cas de tumeurs chimiorésistantes.

b) Blocage des voies métaboliques des sphingolipides

Différentes voies de consommation du Cer ont été corrélées à une résistance des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques. Ainsi, plusieurs approches d'inhibition de ces voies de consommation ont été développées aux cours des dernières années. En revanche, il est important de noter que du fait de la complexité du réseau des voies métaboliques des SLs, le blocage d'une voie de conversion du Cer ne se traduit pas nécessairement par une augmentation de son taux intracellulaire. En effet, la cellule est apte à s'adapter à l'action d'un inhibiteur en activant une autre voie de consommation du Cer. Ceci est d'autant plus vrai que l'augmentation intracellulaire en Cer est souvent corrélée à l'action non sélective d'inhibiteurs vis-à-vis de différentes voies (GCS vs 1-O-acylcéramide synthase et SMS vs SMSr par exemple).

- *La voie Cer-Sph-S1P*

La voie Cer-Sph-S1P est l'une des voies les plus étudiées dans la modulation du métabolisme des SLs de par le fort impact de la balance entre le Cer et la S1P.^{12, 25} Cet équilibre est déplacé au profit de l'accumulation en S1P, promotrice de la survie cellulaire, la prolifération et la migration des cellules cancéreuses. Plusieurs perturbations sont à l'origine de ce déséquilibre :^{30, 35, 36} ENREF 38 les CDases et les SKs sont surexprimées dans de nombreux cancers alors que la S1PP³⁷ et la S1P lyase³⁸ y sont sous-exprimées. Les CDases et les SKs sont donc des cibles pharmacologiques intéressantes pour rétablir le taux intracellulaire en Cer.

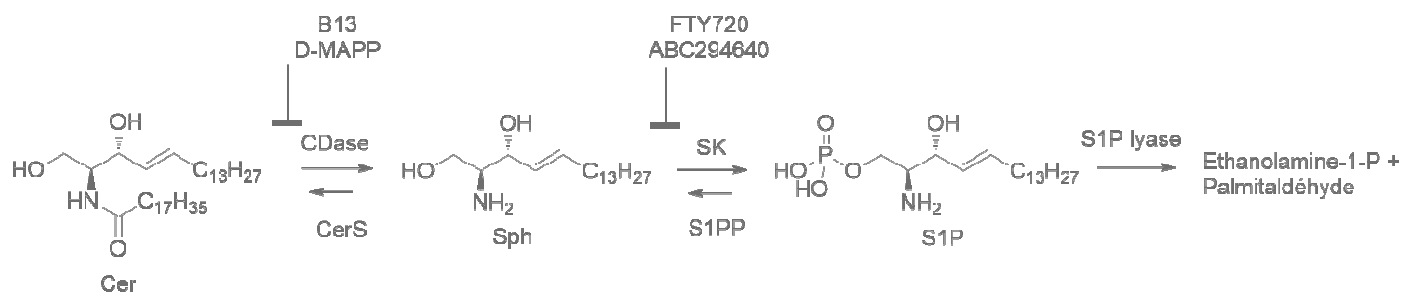


Schéma 2 - Déséquilibre de la voie céramide/sphingosine/sphingosine-1-phosphate

Parmi les inhibiteurs connus de CDases (cf. Figure 4), on trouve le composé (1*R*,2*R*)-*N*-myristoylamino-4'-nitro-phénylpropane-1,3-diol (B13) et le (1*S*,2*R*)-*N*-myristoylamino-phénylpropan-1-ol (D-MAPP), avec des IC_{50} respectives de 13 μ M et 30 μ M sur des cellules MCF-7. Différents analogues isostériques du B13 et du D-MAPP, inhibiteurs de CDases, ont été synthétisés, permettant d'améliorer les IC_{50} (entre 2 et 10 μ M) sur la même lignée cellulaire.^{39, 40}

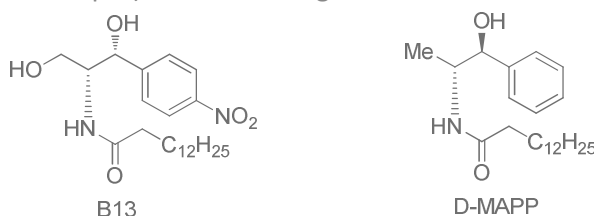


Figure 4 - Structures des inhibiteurs connus de CDases

La SK existe sous deux isoformes : SK1 et SK2. Un grand nombre d'inhibiteurs de SKs, principalement de SK1, a été décrit au cours des trente dernières années (cf. Figure 5).^{35, 41}

Des analogues de la Sph, tels que la diméthylsphingosine (DMS), la dihydrosphingosine (DhS) et le safinol, ont été les premiers composés identifiés possédant des propriétés inhibitrices de SKs, non spécifiques de SK1 ou SK2 et pouvant aussi inhiber la PKC. Quelques années après, les composés B-5354c,⁴² F12509A,⁴³ S-15183a et S-15183b,⁴⁴ isolés à partir d'une bactérie marine ou de champignons, ont été décrits comme inhibiteurs de SKs *in vitro*. Le criblage d'une bibliothèque de composés chimiques a permis d'identifier de nouveaux inhibiteurs de SK1 et SK2 non lipidiques appelés les SKi (SKI-I à SKI-V).⁴⁵ Différents analogues de la Sph, spécifiques de SK1, ont par la suite été synthétisés, dont le composé hydrosoluble SK1-I (BML-258),⁴⁶ et les composés 6ag, 9ab et 12aa.⁴⁷ Le composé FTY720, un immunosuppresseur analogue de la Sph développé par Novartis, a récemment été identifié comme compétiteur de la Sph et inhibiteur spécifique des SKs.⁴⁸

Enfin, seul le composé ABC294640 a été identifié comme inhibiteur sélectif de SK2.⁴⁹

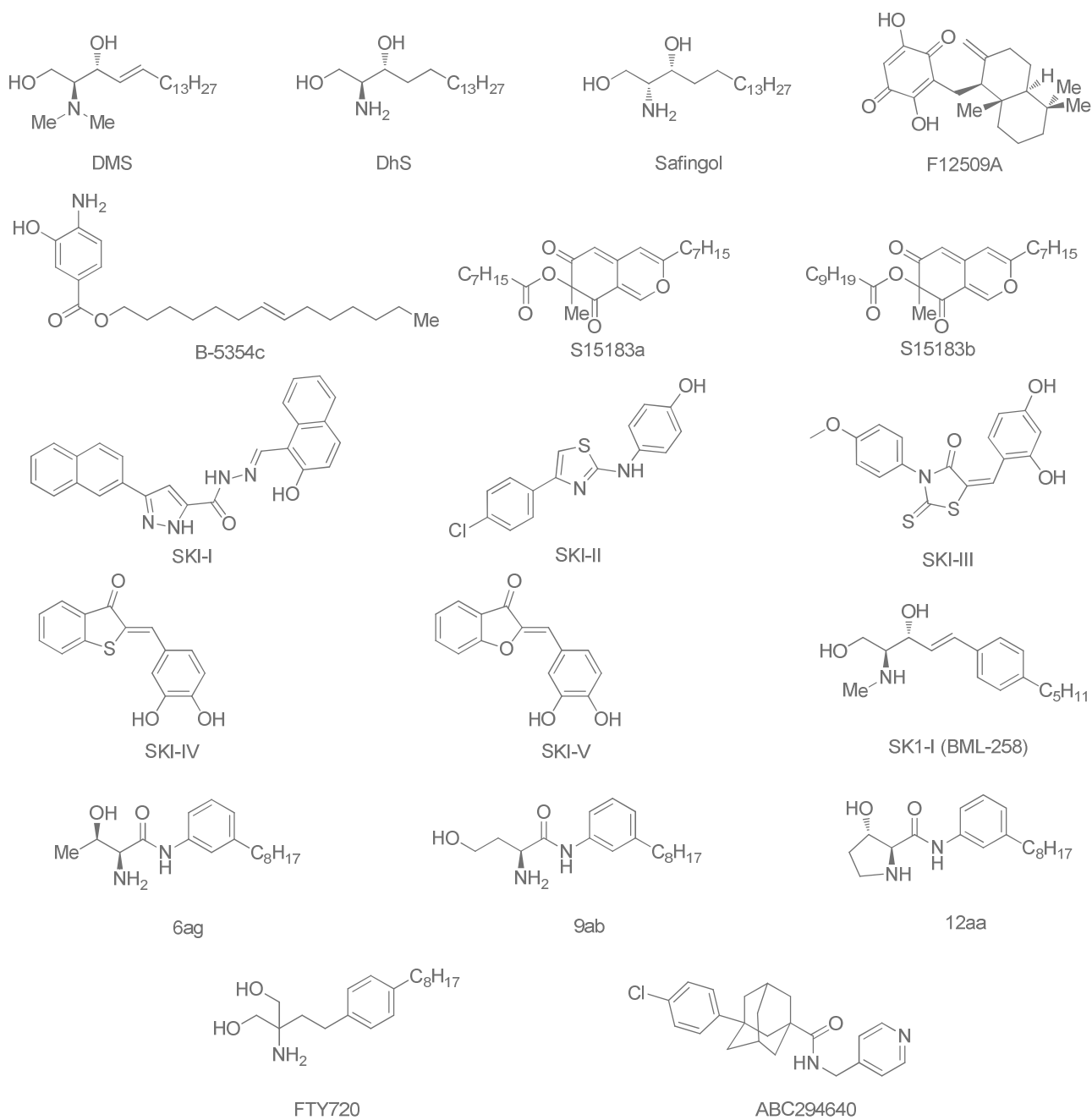


Figure 5 - Structure des inhibiteurs connus de SKs

- *La voie Cer-C1P*

Une augmentation de l'activité de CERK a été observée dans le cancer du foie,²¹ des poumons^{50, 51} et du sein,⁵¹ induisant une conversion accrue du Cer en C1P. Le C1P est un SL mitogénique impliqué dans la survie cellulaire en inhibant la SPT et la A-SMase.^{34, 52} ENREF 35

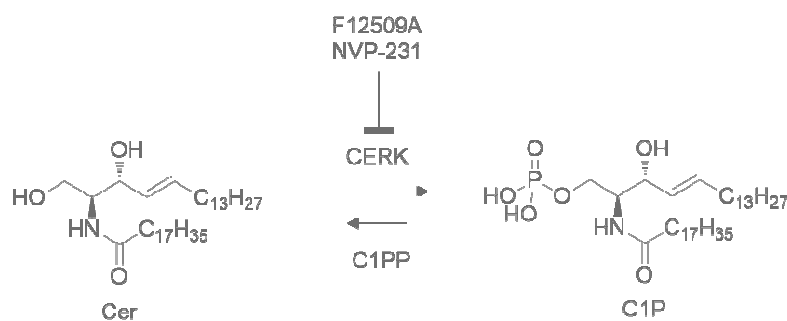


Schéma 3 - Déséquilibre de la voie céramide/céramide-1-phosphate

Deux classes d'inhibiteurs de CERK ont été développées afin de déplacer l'équilibre Cer-C1P en faveur du Cer (cf. Figure 6). Dans un premier temps, certains inhibiteurs de la SK1, notamment le F12509A, ont été identifiés comme inhibiteurs modérés de CERK, avec une IC_{50} supérieure à 100 μ M *in vitro*. Le K1, un analogue du F12509A, s'est révélé être un meilleur inhibiteur, sélectif de CERK, avec une IC_{50} de 10 μ M *in vitro*.⁵³

Par la suite, le composé NVP-231 a été décrit comme un fort inhibiteur spécifique de CERK, avec une IC_{50} de 12 nM *in vitro* et une IC_{50} de 60 nM sur des cellules MCF-7.⁵⁴

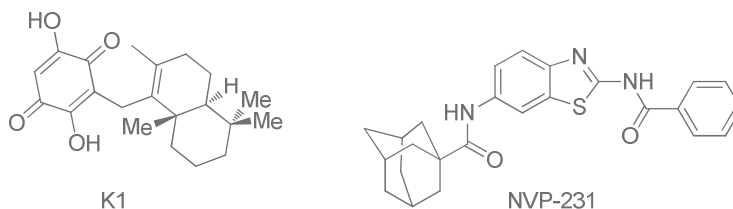


Figure 6 - Structures des inhibiteurs connus de la CERK

- *La voie Cer-GSLs*

Une autre voie de consommation du Cer est la conversion de celui-ci en GlcCer puis en GSLs complexe. La glycosylation du Cer par la GCS pour donner la GlcCer est aberrante dans de nombreux cancers. Cette conversion accrue du Cer en GlcCer est due à une surexpression de la GCS, rendant les cellules cancéreuses résistantes à plusieurs agents chimiothérapeutiques.^{11, 55} L'inhibition de cette enzyme dans des cancers résistants permettrait de rétablir la concentration en Cer, diminuer le taux de GlcCer et ainsi sensibiliser les cellules cancéreuses à la chimiothérapie.

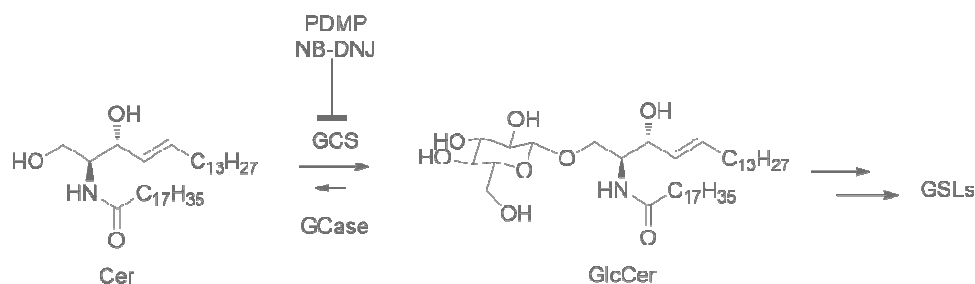


Schéma 4 - Déséquilibre de la voie céramide/glucosylcéramide/glycosphingolipides

Deux familles d'inhibiteurs pharmacologiques de GCS ont été décrites. La première classe d'inhibiteurs de GCS concerne les « drogues P » (cf. Figure 7). Le *D-threo*-1-phényl-2-décanoylamino-3-morpholinopropanol (PDMP),⁵⁶ un mime du GlcCer, a été le premier composé de cette famille capable d'inhiber la GCS avec une IC_{50} de 20 μ M, ainsi que d'autres enzymes impliquées dans le métabolisme des GSLs. Différents analogues du PDMP, plus sélectifs de la GCS, ont par la suite été synthétisés. Seuls les analogues de configuration *D-threo* inhibent la GCS. Parmi ces analogues, on retrouve le PPMP (70% d'inhibition de GCS à 20 μ M et 23% à 2 μ M),⁵⁶ le PPPP (IC_{50} =0.5 μ M)⁵⁷ et le composé CCG-203586 (IC_{50} =27nm),⁵⁸ ayant de meilleures activités inhibitrices de GCS que le PDMP. Au cours du développement de cette série, l'introduction d'un motif éthylène-dioxy a conduit à des dérivés ciblant sélectivement la GCS sans affecter la 1-*O*-acylcéramide synthase.⁵⁷ Le dérivé Genz-112638 (IC_{50} =24nm) développé par Genzyme (Eliglustat) est commercialisé dans le traitement de la maladie de Gaucher de type I, caractérisée par une surcharge lysosomale en GlcCer n'affectant pas le système nerveux central, selon une stratégie dite « par privation de substrat ».⁵⁹

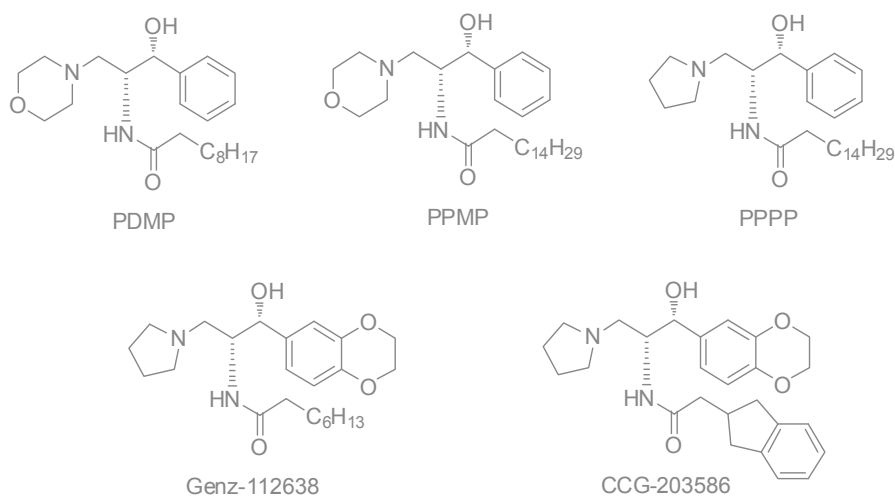


Figure 7 - Structure des inhibiteurs connus de la GCS de type "drogues P"

La deuxième famille d'inhibiteurs est constituée d'iminosucres (cf. Figure 8), principalement de type pipéridine. La *N*-butyl-1-déoxynojirimycine (NB-DNJ ou Miglustat, Zavesca®, OGT 918) a été le premier composé de cette famille identifié comme compétiteur du Cer en inhibant la GCS (IC_{50} =20 μ M), mais inhibant aussi la α -galactosidase (IC_{50} =0.57 μ M).⁶⁰ Il est le premier composé à avoir été commercialisé pour le traitement de la maladie de Gaucher de type I, mais provoquant des effets secondaires indésirables de par son manque de sélectivité. De nombreux analogues de la NB-DNJ ont été synthétisés en vue d'optimiser le pouvoir inhibiteur et la sélectivité.⁶¹ Les analogues *N*-butyl-1-déoxygalactonojirimycine (NB-DGJ) et *N*-nonyl-1-déoxygalactonojirimycine (C9-DGJ) se sont révélés plus sélectifs de la GCS avec une activité inhibitrice similaire aux analogues DNJ.⁶² Le meilleur inhibiteur de GCS décrit dans cette famille est l'analogue de type *L-ido*-1-déoxynojirimycine (*L-ido* -

DNJ), avec une IC_{50} de $0.1\mu M$.⁶³ Ce composé a été développé comme un inhibiteur puissant et sélectif de GCS dans le traitement de résistance à l'insuline dans des modèles de diabète de type II.

D'autres iminosucres, tels que des pyrrolidines, se sont révélés inhibiteurs de la GCS. La *N*-butyl-2,5-dihydroxyméthyl-3,4-dihydropyrrolidine (NB-DMDP) a été identifiée comme inhibiteur de la GCS mais aussi de la α -galactosidase, de la même façon que la NB-DNJ.⁶⁰ D'autres dérivés pyrrolidiniques, inhibiteurs de la GCS, ont été synthétisés au laboratoire.⁶⁴ Le plus actif d'entre eux (76% d'inhibition de la GCS à $10\mu M$) est la pyrrolidine *n*-octyl. Ce composé cytotoxique induit l'accumulation du Cer provoquant la mort des cellules de mélanome B16 (70% de mort cellulaire à $5\mu M$).

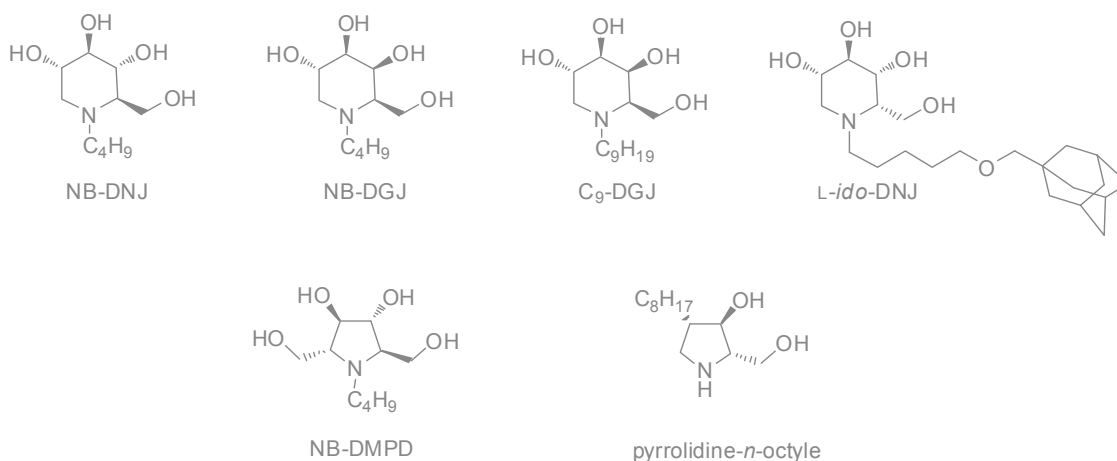


Figure 8 - Structure des inhibiteurs connus de la GCS de type iminosucres

Il est important de noter que sur l'ensemble des inhibiteurs de la GCS, ceux étant cytotoxiques (par exemples, PDMP dans la famille des drogues P ou la pyrrolidine *n*-octyle dans la famille des iminosucres) induiraient une accumulation en Cer par manque de sélectivité d'inhibition de la GCS vis-à-vis d'autres enzymes telles que la 1-*O*-acylcéramide synthase. Cette cytotoxicité limite leur utilisation dans le traitement de maladies de surcharge lysosomale mais est favorable dans une thérapie anticancéreuse.

- La voie Cer-SM

Enfin, la conversion du Cer en SM représente la dernière voie de consommation du Cer.

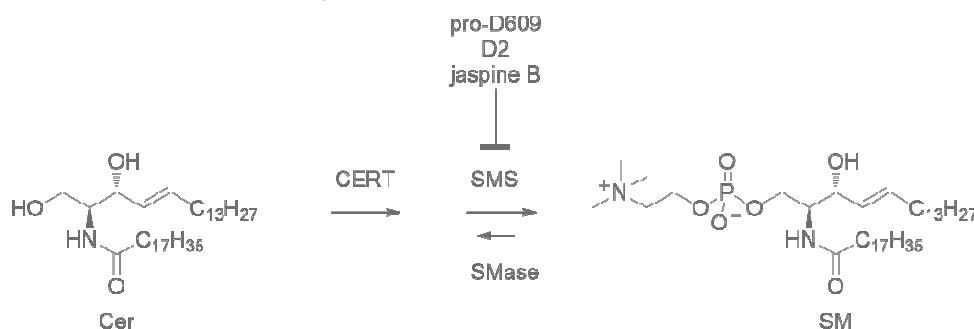


Schéma 5 - Déséquilibre de la voie céramide/sphingomyéline

L'enzyme impliquée dans cette conversion est la SMS. Une augmentation de son activité a été observée dans des cellules fibroblastes de poumons humains transformées SV40-WI38⁶⁵ et des cellules de leucémie humaine chimiorésistante HL60/ADR.⁶⁶ Son inhibition pharmacologique favoriserait ainsi l'accumulation intracellulaire en Cer et rétablirait l'apoptose en réponse à la chimiothérapie sur différents cancers.

Le tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]-décan-8-yl-dithiocarbonate de potassium (D609) (cf. Figure 9), un composé anti-tumoral cytotoxique, a été le premier composé identifié avec une activité inhibitrice modérée de SMS ($IC_{50}=375\mu M$ *in vitro* et $EC_{50}=90\mu M$ *in vivo*). Cette activité modérée a été attribuée à l'instabilité oxydative du groupement xanthate de ce composé. Ainsi, un analogue du D609 (pro-D609), plus stable et plus actif, a été synthétisé.⁶⁷

Deux nouveaux composés, D1 ($IC_{50}=75\mu M$ sur SMS2) et D2 ($IC_{50}=14\mu M$ sur SMS2), ont été identifiés comme inhibiteurs de SMS, spécifique de la SMS2, par criblage virtuel basée sur un modèle structural de la protéine.⁶⁸ Une optimisation de la structure de D2 a permis d'identifier une nouvelle famille d'inhibiteurs de SMS2 avec des $IC_{50}<20\mu M$, constitués des composés D2, D24, D28, D29, D30 et D31 (cf. Figure 9).

Des travaux antérieurs au laboratoire ont permis d'identifier la jaspine B comme un exemple unique d'inhibiteur cytotoxique de SMS dont l'action pro-apoptotique reposerait sur sa capacité à augmenter les taux intracellulaires en Cer (cf. Figure 9).⁶⁹

Dans le contexte de l'inhibition de la SMS, de manière analogue à l'inhibition de la GCS, l'impact du taux intracellulaire en Cer pourrait dépendre de la sélectivité vis-à-vis d'une enzyme analogue, la SMSr, catalysant le transfert d'un groupement phosphoéthanolamine sur le Cer.¹⁸

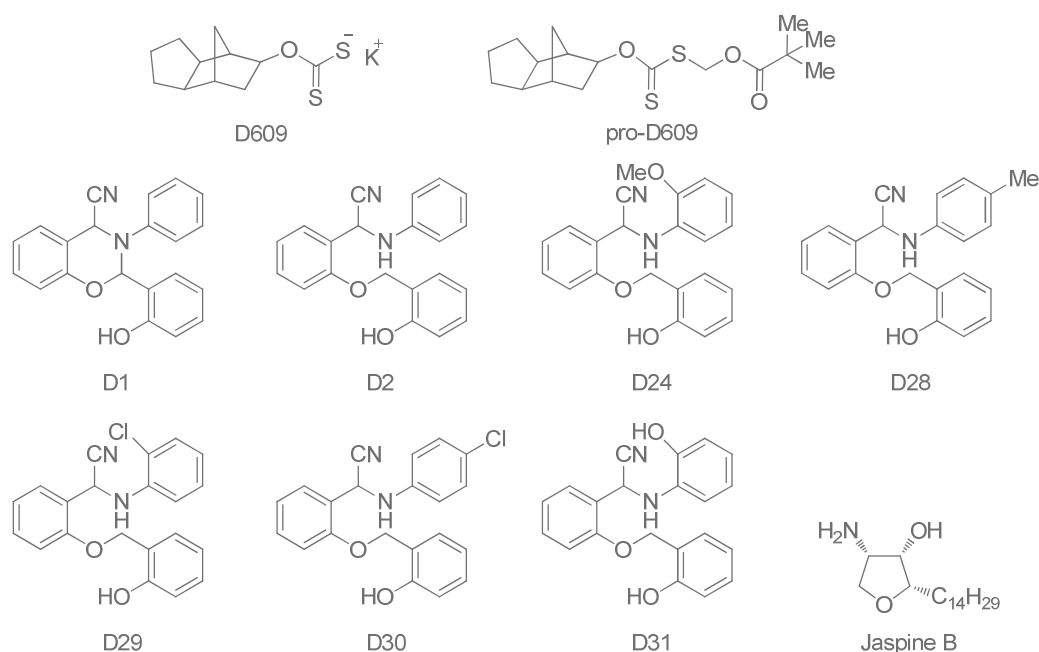


Figure 9 - Structure des inhibiteurs connus des SMS

Une stratégie différente de l'inhibition de la SMS peut être adoptée pour bloquer la conversion du Cer en SM. Afin d'être transformé en SM par la SMS, le Cer synthétisé *de novo* au niveau du RE doit être transporté jusqu'à l'appareil de Golgi où se situe la SMS. Cette voie de biosynthèse de la SM fait ainsi intervenir une étape de transport du Cer, non vésiculaire et ATP-dépendante, par la protéine CERT.¹⁷ L'inhibition du transfert de Cer par la protéine CERT permettrait ainsi de rétablir le taux intracellulaire en Cer. Cette stratégie originale sera détaillée dans la partie suivante.

II. La protéine de transfert de céramide CERT

1) Une cible pertinente dans une stratégie anti-tumorale

En transportant le Cer en vue de sa conversion en SM, la protéine CERT devient une cible pharmacologique intéressante dans le cadre de cancers chimiorésistants. En effet, cette protéine est inactivée et clivée par des caspases en réponse à un stress cellulaire apoptotique.^{70, 71} Cette inactivation contribue à la diminution de la biosynthèse de la SM et à l'accumulation du Cer.

Par ailleurs, plusieurs études de criblage d'ARNs interférents sur différentes lignées de cellules cancéreuses de type HCT-116 (cancer du côlon), A549 (cancer du poumon) et MDA-MB-231 (cancer du sein) ont été menées afin de déterminer les gènes influençant la sensibilité et la résistance de ces cellules à des agents chimiothérapeutiques (paclitaxel, doxorubicine, 5-FU et cis-platine). Il a ainsi été découvert que la protéine CERT est surexprimée dans ces lignées de cellules cancéreuses multi-résistantes aux agents chimiothérapeutiques (HCT-116, A549 et MDA-MB-231) ainsi que dans des tumeurs ovariennes résiduelles après traitement au paclitaxel.⁷² De plus, la sous-régulation (par siRNA), de même que l'inhibition pharmacologique de la protéine CERT, permet d'augmenter la concentration intracellulaire en Cer pro-apoptotique et resensibilise les lignées résistantes à ces agents chimiothérapeutiques.^{72, 73} La surexpression de la protéine CERT (ou COL4A3BP) a également été identifiée comme un déterminant de la sensibilité au paclitaxel de lignées cellulaires de cancer du sein multirésistantes HER2⁺ (lignée cellulaire de cancer du sein particulièrement agressif avec de mauvais pronostics, dont les cellules surexpriment la protéine HER2).⁷³

Ainsi l'inhibition du transport de Cer par la protéine CERT est une stratégie pertinente pour resensibiliser les cellules cancéreuses résistantes à la chimiothérapie.

2) Structure et fonctionnement de la protéine

CERT est une protéine cytosolique de 68kDa. Elle est responsable du transfert du Cer entre le RE et l'appareil de Golgi, en vue de sa conversion en SM. Cette protéine est constituée d'un motif et de trois domaines importants : à l'extrémité N-terminale se trouve le domaine PH, la région médiane contenant un domaine riche en sérine (SR) et le motif FFAT, et le domaine START quant à lui, est localisé à l'extrémité C-terminale.



Figure 10 - Domaines et motif de la protéine CERT

a) Le motif FFAT

La région médiane entre les domaines PH et START est constituée d'environ 250 acides aminés. Le motif FFAT (deux phénylalanines dans un secteur acide), contenu dans cette région, est un court motif peptidique de la protéine CERT. Il est capable de s'associer avec la protéine VAP-A résidant dans la membrane du RE.⁷⁴ Cette interaction est importante pour l'activité de transport du Cer par CERT entre le RE et l'appareil de Golgi. Elle est contrôlée par la phosphorylation de la protéine au niveau de la sérine-315, proche du motif FFAT. Cette phosphorylation augmente l'interaction entre les protéines CERT et VAP-A, favorisant ainsi le transfert du Cer. La (ou les) kinase(s) à l'origine de cette phosphorylation reste(nt) encore à élucider.⁷⁵

b) Le domaine PH

Le domaine « pleckstrin homology » (PH) de CERT, constitué d'une centaine d'acides aminés, est le domaine N-terminal de la protéine. Il est capable de se lier au phosphatidylinositol-4-monophosphate (PI4P), principalement localisé dans l'appareil de Golgi. Sa structure, ainsi que le site de liaison du PI4P, ont récemment été déterminés par une étude RMN en solution.⁷⁶ Ce domaine est apparu indispensable *in vivo* pour le transport du Cer par CERT entre le RE et l'appareil de Golgi. Une mutation au niveau de ce domaine est à l'origine de la perte de fonction de CERT au sein de la lignée cellulaire LY-A ayant conduit à la découverte de la protéine par le groupe de Hanada.⁷⁶

c) Le domaine START

Le domaine C-terminal de CERT, « steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer » (START), comprend environ 230 acides aminés. Il est responsable de l'extraction du Cer des membranes donneuses (RE), plus spécifiquement du Cer naturel de configuration D-érythro, et de son transfert dans des membranes acceptuses (appareil de Golgi). Il est capable de transférer des Cer avec différentes longueurs de chaînes (C6, C14, C16, C18 et C20), ainsi que le C10-diacylglycérol (DAG), le C16-dihydrocéramide et le C16-phytocéramide (PhytoCer).⁷⁷ Plusieurs structures RX du domaine START de CERT, sous sa forme apo ou co-cristallisée avec différents ligands, ont permis d'identifier le site de liaison et le mode d'interaction du Cer avec ce domaine, expliquant ainsi la reconnaissance spécifique du D-érythro-Cer (cf. Chapitre II). Ce domaine est apparu nécessaire et suffisant *in vitro* pour le transfert intermembranaire du Cer.^{78, 79} En revanche, les autres domaines sont indispensables pour le maintien de l'activité de transport interorganite de la protéine CERT au sein de la cellule.

d) Le fonctionnement de la protéine

Chacun de ces domaines ou motif possède un rôle spécifique et indispensable dans le transport intracellulaire du Cer. Le motif FFAT permet ainsi la reconnaissance avec le RE *via* les protéines VAPs, le domaine PH assure la reconnaissance avec l'appareil de Golgi *via* PI4P et le domaine START extrait et transfère le Cer d'une membrane à l'autre dans des zones dites de microcontact entre le RE et l'appareil de Golgi (environ distants de 10nm).^{74, 80} Cette activité de transfert du Cer entre le RE et l'appareil de Golgi par la protéine CERT est régulée par différentes phosphorylations/déphosphorylations *in vivo* au niveau du motif riche en sérine (cf. Figure 11) ENREF 73.

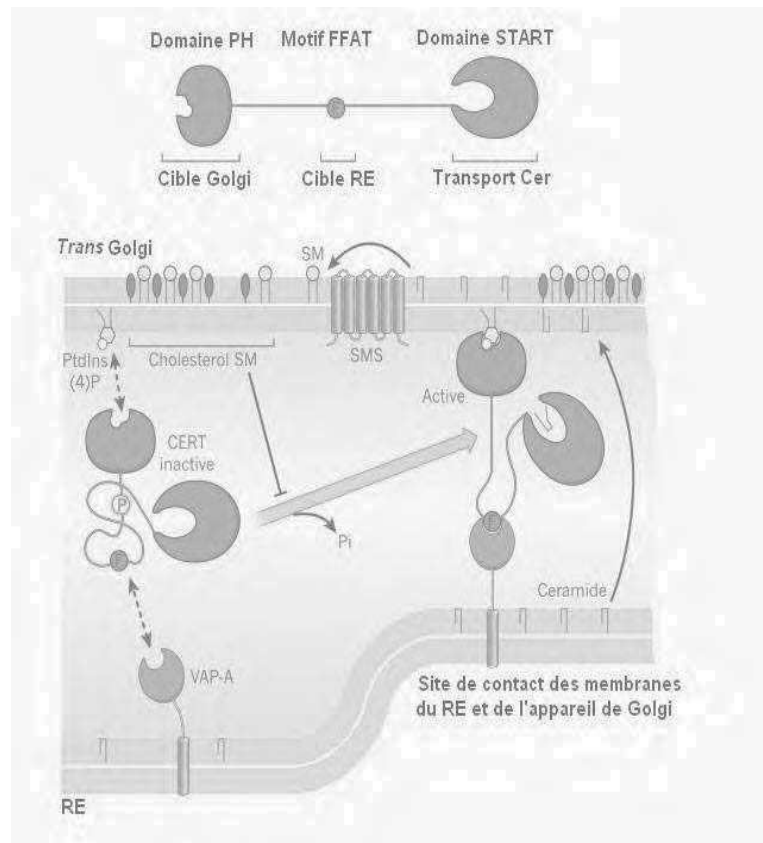


Figure 11 - Régulation du transfert de céramide par la protéine CERT, adapté de J. Holthuis et A. Menon, *Nature*, 2014, 510, 48-57.⁵

Deux kinases sont impliquées dans la phosphorylation de la protéine CERT. La première, la protéine kinase D (PKD), est responsable de la phosphorylation de la sérine 132 (Ser132) ; puis l'isoforme $\gamma 2$ de la kinase caséine 1 (CK1 $\gamma 2$), phosphoryle à plusieurs reprises des sérines et thréonines du motif riche en sérine.^{81, 82} Les phosphorylations multiples de CERT entraînent l'inhibition simultanée de l'activité de transfert du domaine START et de la liaison du domaine PH avec les PI4P présent dans la membrane du domaine de Golgi. La protéine phosphorylée adopterait une conformation inactive, réprimant mutuellement les fonctions des domaines PH et START,⁸³ ayant pour conséquence une diminution de production de SM. Ces protéines exercent donc un rétrocontrôle négatif de la protéine CERT.

La diminution de SM et de cholestérol dans la membrane plasmique entraîne la déphosphorylation de la région riche en sérine de CERT.⁷⁴ La protéine phosphatase 2C (PP2C), en interaction avec la protéine VAP-A dans le RE, serait responsable de cette déphosphorylation, activant ainsi la protéine CERT.⁸⁴ ENREF 77 Sous sa forme active, la protéine peut alors cibler simultanément le RE et l'appareil de Golgi dans une zone de microcontact entre ces deux organelles et transférer le Cer du RE vers l'appareil de Golgi.

Le mécanisme exact d'activation et d'inhibition de la protéine CERT reste encore à élucider.

3) Inhibiteurs connus du transport de céramide par CERT

Une seule famille d'inhibiteurs de la protéine CERT a été rapportée à ce jour : les *N*-(3-hydroxy-1-hydrométhyl-3-phénylpropyl)alcanamide (HPAs).⁸⁵

Différents analogues HPAs avec différentes longueurs de chaînes ont été synthétisés, puis leur potentiel inhibiteur de transport de Cer par CERT a été évalué. Le dérivé dodécanamide HPA-12 a été identifié comme inhibiteur spécifique du transport de Cer, agissant comme un antagoniste de la protéine CERT (cf. Figure 12).^{86, 87}

La relation structure-activité de cette famille de composés a faiblement été étudiée. La présence des groupements hydroxyles en positions C-1 et C-3 s'est révélée indispensable pour inhiber la biosynthèse de SM. L'ajout d'un alcool secondaire en position C-2 ne semble apporter aucun gain d'activité. Les analogues avec des chaînes acyles comprises entre 11 et 15 atomes de carbone ont des activités inhibitrices comparables (IC_{50} de 50nM pour HPA-13, 70nM pour HPA-12 et HPA-14, et de 90nM pour HPA-15), alors que la présence de chaînes alcanamides plus courtes ou plus longues entraîne une perte considérable voire totale de l'activité ($IC_{50}>1000nM$). Enfin, la modification de la configuration des stéréocentres C-1 et C-3 impacte fortement l'activité d'inhibition.⁸⁸ Parmi les quatre diastéréoisomères de l'HPA-12, seule la paire d'énantiomères (1*R**,3*R**), a été évaluée individuellement pour l'inhibition de la biosynthèse *de novo* de la SM. Le (1*R*,3*R*)-HPA-12 était alors apparu comme le stéréoisomère le plus actif.⁷⁷ Ainsi, plusieurs (1*R*,3*R*)-HPAs avec des chaînes acyles entre 13 et 16 atomes de carbone ont ainsi été co-cristallisés avec le domaine START de CERT.⁷⁸ Par la suite, la stéréochimie du dérivé HPA-12 le plus actif a été corrigée en (1*R*,3*S*).⁸⁹⁻⁹¹

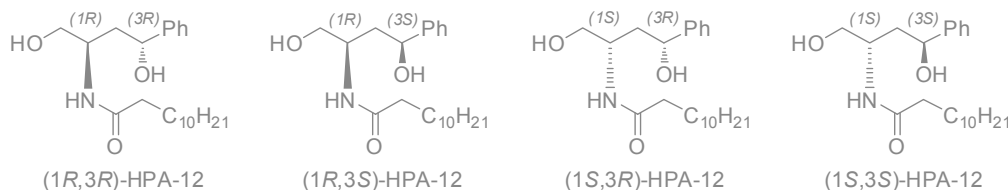


Figure 12 - Structure des quatre diastéréoisomères de l'HPA-12, inhibiteur de la protéine CERT

III. Conclusion

Pour conclure, les SLs sont des lipides membranaires ayant un rôle structural ainsi qu'un rôle de messenger dans la transduction du signal cellulaire. En effet, certains de ces SLs sont bioactifs ; notamment le Cer et la Sph ont des propriétés proapoptotiques alors que le GlcCer et la S1P possèdent des propriétés prolifératives.

Un réseau de voies enzymatiques interdépendantes, centré sur le Cer, gouverne le métabolisme complexe de ces SLs au sein des différents compartiments cellulaires. Ce mécanisme permet donc d'équilibrer les effets de chaque SL dans la cellule en fonction des stimuli externes.

Ce processus est crucial dans le développement du cancer et est fortement corrélé à l'efficacité d'une thérapie anti-cancéreuse. Dès lors, une perturbation de ce métabolisme en diminuant le taux intracellulaire en Cer au profit des SLs prolifératifs, *via* une sous-régulation des trois voies de production du Cer (synthèse *de novo*, voie de recyclage et catabolisme de SLs complexes) et/ou une surconsommation du Cer (conversion accrue en S1P, C1P, GlcCer et SM) confère aux cellules cancéreuses un caractère de résistance aux agents chimiothérapeutiques. Ainsi, différentes

stratégies de modulation du métabolisme des SLs ont été développées au cours des dernières années dans le cadre de thérapie anti-cancéreuse pour rétablir la concentration intracellulaire en Cer.

La première stratégie consiste à générer et accumuler le Cer suppresseur de tumeur dans la cellule en stimulant la synthèse *de novo* du Cer ou l'hydrolyse de la SM.

La seconde stratégie, pouvant être associée avec la première, consiste à bloquer les voies de consommation du Cer. Dans cette approche, de nombreux inhibiteurs des enzymes de conversion du Cer (CDases, SK, CERK, GCS et SMS) ont été développés. En revanche, très peu de travaux ont été réalisés afin d'inhiber le transport du Cer par la protéine CERT.

La protéine CERT transfère le Cer du RE vers l'appareil de Golgi, où il est converti en SM par la SMS. Le domaine START de CERT est responsable de l'extraction du Cer des membranes du RE, de son transfert puis de son relargage dans les membranes de l'appareil de Golgi. Malgré la pertinence de cette cible dont l'expression est un déterminant de la sensibilité de certaines lignées cancéreuses à différents agents chimiothérapeutiques, une seule famille d'inhibiteurs de la protéine CERT, les HPAs, a été identifiée à ce jour. De plus, depuis leur découverte en 2001, aucune optimisation de cette structure n'a été décrite. Ainsi, ces travaux de thèse ont visés à identifier de nouveaux inhibiteurs potentiels du transport de Cer par CERT en tant qu'agents de resensibilisation de lignées de cellules cancéreuses chimiorésistantes.

Cette recherche d'antagonistes de la protéine CERT s'est concentrée dans un premier temps sur le développement d'une méthode d'identification de ligands du domaine START de CERT, combinant une approche *in silico* et *in vitro* (cf. Chapitre II). Par la suite, certains des ligands identifiés ont été synthétisés (cf. Chapitres III et IV), puis évalués biologiquement.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Kolter, T.; Sandhoff, K. Sphingolipids—Their Metabolic Pathways and the Pathobiochemistry of Neurodegenerative Diseases. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1532-1568.
2. Wennekes, T.; van den Berg, R. J. B. H. N.; Boot, R. G.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; Aerts, J. M. F. G. Glycosphingolipids—Nature, Function, and Pharmacological Modulation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 8848-8869.
3. Morales, A.; Lee, H.; Goñi, F.; Kolesnick, R.; Fernandez-Checa, J. Sphingolipids and cell death. *Apoptosis* **2007**, 12, 923-939.
4. Fox, T. E.; Finnegan, C. M.; Blumenthal, R.; Kester, M. The clinical potential of sphingolipid-based therapeutics. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, 63, 1017-1023.
5. Holthuis, J. C. M.; Menon, A. K. Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature* **2014**, 510, 48-57.
6. Konstantynowicz-Nowicka, K.; Harasim, E.; Baranowski, M.; Chabowski, A. New Evidence for the Role of Ceramide in the Development of Hepatic Insulin Resistance. *PLoS ONE* **2015**, 10, e0116858.
7. Maceyka, M.; Spiegel, S. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature* **2014**, 510, 58-67.
8. Ogretmen, B.; Hannun, Y. A. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, 4, 604-616.
9. Ségui, B.; Andrieu-Abadie, N.; Jaffrézou, J.-P.; Benoist, H.; Levade, T. Sphingolipids as modulators of cancer cell death: Potential therapeutic targets. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembranes* **2006**, 1758, 2104-2120.
10. Ogretmen, B. Sphingolipids in cancer: Regulation of pathogenesis and therapy. *FEBS Lett.* **2006**, 580, 5467-5476.
11. Lavie, Y.; Cao, H.-t.; Bursten, S. L.; Giuliano, A. E.; Cabot, M. C. Accumulation of Glucosylceramides in Multidrug-resistant Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 19530-19536.
12. Kester, M.; Kolesnick, R. Sphingolipids as therapeutics. *Pharmacol. Res.* **2003**, 47, 365-371.
13. Reynolds, C. P.; Maurer, B. J.; Kolesnick, R. N. Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy. *Cancer Lett.* **2004**, 206, 169-180.
14. Tidhar, R.; Futerman, A. H. The complexity of sphingolipid biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Mol. Cell Res.* **2013**, 1833, 2511-2518.
15. Hanada, K. Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids* **2003**, 1632, 16-30.
16. Pewzner-Jung, Y.; Ben-Dor, S.; Futerman, A. H. When Do Lasses (Longevity Assurance Genes) Become CerS (Ceramide Synthases)? Insights into the regulation of ceramide synthesis. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 25001-25005.
17. Hanada, K.; Kumagai, K.; Yasuda, S.; Miura, Y.; Kawano, M.; Fukasawa, M.; Nishijima, M. Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* **2003**, 426, 803-809.

18. Tafesse, F. G.; Vacaru, A. M.; Bosma, E. F.; Hermansson, M.; Jain, A.; Hilderink, A.; Somerharju, P.; Holthuis, J. C. M. Sphingomyelin synthase-related protein SMSr is a suppressor of ceramide-induced mitochondrial apoptosis. *J. Cell Sci.* **2014**, 127, 445-454.
19. Levade, T.; Jaffrézou, J.-P. Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why? *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids* **1999**, 1438, 1-17.
20. Marchesini, N.; Hannun, Y. A. Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochem. Cell Biol.* **2004**, 82, 27-44.
21. Sugiura, M.; Kono, K.; Liu, H.; Shimizugawa, T.; Minekura, H.; Spiegel, S.; Kohama, T. Ceramide Kinase, a Novel Lipid Kinase: Molecular cloning and functional characterization. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 23294-23300.
22. Kihara, A.; Mitsutake, S.; Mizutani, Y.; Igarashi, Y. Metabolism and biological functions of two phosphorylated sphingolipids, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate. *Prog. Lipid Res.* **2007**, 46, 126-144.
23. Hannun, Y. A.; Obeid, L. M. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, 9, 139-150.
24. Kitatani, K.; Idkowiak-Baldys, J.; Hannun, Y. A. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell. Signalling* **2008**, 20, 1010-1018.
25. Tani, M.; Ito, M.; Igarashi, Y. Ceramide/sphingosine/sphingosine 1-phosphate metabolism on the cell surface and in the extracellular space. *Cell. Signalling* **2007**, 19, 229-237.
26. Levade, T.; Malagarie-Cazenave, S.; Gouazé, V.; Ségui, B.; Tardy, C.; Betito, S.; Andrieu-Abadie, N.; Cuvillier, O. Ceramide in Apoptosis: A Revisited Role. *Neurochem. Res.* **2002**, 27, 601-607.
27. Blitterswijk, W. J. v.; Luit, A. H. v. d.; Veldman, R. J.; Verheij, M.; Borst, J. Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem. J.* **2003**, 369, 199-211.
28. Birbes, H.; Bawab, S. E.; Obeid, L. M.; Hannun, Y. A. Mitochondria and ceramide: intertwined roles in regulation of apoptosis. *Adv. Enz. Reg.* **2002**, 42, 113-129.
29. Ruvolo, P. Ceramide regulates cellular homeostasis via diverse stress signaling pathways. *Leukemia* **2001**, 15, 1153-1160.
30. Beckham, T. H.; Cheng, J. C.; Marrison, S. T.; Norris, J. S.; Liu, X. Interdiction of Sphingolipid Metabolism to Improve Standard Cancer Therapies. *Adv. Cancer Res.* **2013**, 117, 1-36.
31. Spiegel, S.; Milstien, S. Sphingosine-1-phosphate: signaling inside and out. *FEBS Lett.* **2000**, 476, 55-57.
32. Gulbins, E.; Kolesnick, R. Raft ceramide in molecular medicine. *Oncogene* **2003**, 22, 7070-7077.
33. Delgado, A.; Fabriàs, G.; Casas, J.; Abad, J. L. Chapter Eight - Natural Products as Platforms for the Design of Sphingolipid-Related Anticancer Agents. In *Adv. Cancer Res.*, James, S. N., Ed. Academic Press: **2013**, 117, 237-281.
34. Gangoiti, P.; Granado, M. H.; Alonso, A.; Goñi, F. M.; Gómez-Muñoz, A. Implication of Ceramide, Ceramide 1-Phosphate and Sphingosine 1-Phosphate in Tumorigenesis. *Translational Oncogenomics* **2008**, 3, 81-98.
35. Pyne, N. J.; Pyne, S. Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, 10, 489-503.

36. Taha, T. A.; Mullen, T. D.; Obeid, L. M. A house divided: Ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembranes* **2006**, 1758, 2027-2036.
37. Le Stunff, H.; Galve-Roperh, I.; Peterson, C.; Milstien, S.; Spiegel, S. Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase in regulation of sphingolipid metabolism and apoptosis. *J. Cell. Biol.* **2002**, 158, 1039-1049.
38. Kihara, A.; Ikeda, M.; Kariya, Y.; Lee, E.-Y.; Lee, Y.-M.; Igarashi, Y. Sphingosine-1-phosphate Lyase Is Involved in the Differentiation of F9 Embryonal Carcinoma Cells to Primitive Endoderm. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 14578-14585.
39. Bielawska, A.; Bielawski, J.; Szulc, Z. M.; Mayroo, N.; Liu, X.; Bai, A.; Elojeimy, S.; Rembiesa, B.; Pierce, J.; Norris, J. S.; Hannun, Y. A. Novel analogs of d-e-MAPP and B13. Part 2: Signature effects on bioactive sphingolipids. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 1032-1045.
40. Szulc, Z. M.; Mayroo, N.; Bai, A.; Bielawski, J.; Liu, X.; Norris, J. S.; Hannun, Y. A.; Bielawska, A. Novel analogs of d-e-MAPP and B13. Part 1: Synthesis and evaluation as potential anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 1015-1031.
41. Alshaker, H.; Sauer, L.; Monteil, D.; Ottaviani, S.; Srivats, S.; Böhler, T.; Pchejetski, D. Chapter Six - Therapeutic Potential of Targeting SK1 in Human Cancers. In *Adv. Cancer Res.*, James, S. N., Ed. Academic Press: **2013**, 117, 143-200.
42. Kono, K.; Tanaka, M.; Ogita, T.; Kohama, T. Characterization of B-5354c, a New Sphingosine Kinase Inhibitor, Produced by a Marine Bacterium. *J. Antibiotics* **2000**, 53, 759-764.
43. Kono, K.; Tanaka, M.; Ogita, T.; Hosoya, T.; Kohama, T. F-12509A, a Nex Sphingosine Kinase Inhibitor, Produced by a Discomycete. *J. Antibiotics* **2000**, 53, 459-466.
44. Kono, K.; Tanaka, M.; Ono, Y.; Hosoya, T.; Ogita, T.; Kohama, T. S-15183a and S-15183b, New Sphingosine Kinase Inhibitors, Produced by a Fungus. *J. Antibiotics* **2001**, 54, 415-420.
45. French, K. J.; Schrecengost, R. S.; Lee, B. D.; Zhuang, Y.; Smith, S. N.; Eberly, J. L.; Yun, J. K.; Smith, C. D. Discovery and Evaluation of Inhibitors of Human Sphingosine Kinase. *Cancer Res.* **2003**, 63, 5962-5969.
46. Paugh, S. W.; Paugh, B. S.; Rahmani, M.; Kapitonov, D.; Almenara, J. A.; Kordula, T.; Milstien, S.; Adams, J. K.; Zipkin, R. E.; Grant, S.; Spiegel, S. A selective sphingosine kinase 1 inhibitor integrates multiple molecular therapeutic targets in human leukemia. *Blood* **2008**, 112, 1382-1391.
47. Xiang, Y.; Asmussen, G.; Booker, M.; Hirth, B.; Kane Jr, J. L.; Liao, J.; Noson, K. D.; Yee, C. Discovery of novel sphingosine kinase 1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 6119-6121.
48. Pyne, S.; Bittman, R.; Pyne, N. J. Sphingosine kinase inhibitors and cancer: seeking the golden sword of hercules. *Cancer Res.* **2011**, 71, 6576-6582.
49. French, K. J.; Zhuang, Y.; Maines, L. W.; Gao, P.; Wang, W.; Beljanski, V.; Upson, J. J.; Green, C. L.; Keller, S. N.; Smith, C. D. Pharmacology and Antitumor Activity of ABC294640, a Selective Inhibitor of Sphingosine Kinase-2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, 333, 129-139.
50. Mitra, P.; Maceyka, M.; Payne, S. G.; Lamour, N.; Milstien, S.; Chalfant, C. E.; Spiegel, S. Ceramide kinase regulates growth and survival of A549 human lung adenocarcinoma cells. *FEBS Lett.* **2007**, 581, 735-740.
51. Pastukhov, O.; Schwalm, S.; Zangemeister-Wittke, U.; Fabbro, D.; Bornancin, F.; Japtok, L.; Kleuser, B.; Pfeilschifter, J.; Huwiler, A. The ceramide kinase inhibitor NVP-231 inhibits breast and lung cancer cell proliferation by inducing M phase arrest and subsequent cell death. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, 171, 5829-5844.

52. Gómez-Muñoz, A. Ceramide 1-phosphate/ceramide, a switch between life and death. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembranes* **2006**, 1758, 2049-2056.
53. Kim, J.-W.; Inagaki, Y.; Mitsutake, S.; Maezawa, N.; Katsumura, S.; Ryu, Y.-W.; Park, C.-S.; Taniguchi, M.; Igarashi, Y. Suppression of mast cell degranulation by a novel ceramide kinase inhibitor, the F-12509A olefin isomer K1. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids* **2005**, 1738, 82-90.
54. Graf, C.; Klumpp, M.; Habig, M.; Rovina, P.; Billich, A.; Baumruker, T.; Oberhauser, B.; Bornancin, F. Targeting Ceramide Metabolism with a Potent and Specific Ceramide Kinase Inhibitor. *Mol. Pharmacol.* **2008**, 74, 925-932.
55. Liu, Y.-Y.; Hill, R. A.; Li, Y.-T. Chapter Three - Ceramide Glycosylation Catalyzed by Glucosylceramide Synthase and Cancer Drug Resistance. In *Adv. Cancer Res.*, James, S. N., Ed. Academic Press: **2013**, 117, 59-89.
56. Abe, A.; Inokuchi, J.-i.; Jimbo, M.; Shimeno, H.; Nagamatsu, A.; Shayman, J. A.; Shukla, G. S.; Radin, N. S. Improved Inhibitors of Glucosylceramide Synthase. *J. Biochem.* **1992**, 111, 191-196.
57. Lee, L.; Abe, A.; Shayman, J. A. Improved Inhibitors of Glucosylceramide Synthase. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 14662-14669.
58. Larsen, S. D.; Wilson, M. W.; Abe, A.; Shu, L.; George, C. H.; Kirchhoff, P.; Showalter, H. D. H.; Xiang, J.; Keep, R. F.; Shayman, J. A. Property-based design of a glucosylceramide synthase inhibitor that reduces glucosylceramide in the brain. *J. Lipid Res.* **2012**, 53, 282-291.
59. McEachern, K. A.; Fung, J.; Komarnitsky, S.; Siegel, C. S.; Chuang, W.-L.; Hutto, E.; Shayman, J. A.; Grabowski, G. A.; Aerts, J. M. F. G.; Cheng, S. H.; Copeland, D. P.; Marshall, J. A specific and potent inhibitor of glucosylceramide synthase for substrate inhibition therapy of Gaucher disease. *Mol. Genet. Metab.* **2007**, 91, 259-267.
60. Platt, F. M.; Neises, G. R.; Dwek, R. A.; Butters, T. D. N-butyldeoxynojirimycin is a novel inhibitor of glycolipid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 8362-8365.
61. Butters, T. D.; van den Broek, L. A. G. M.; Fleet, G. W. J.; Krulle, T. M.; Wormald, M. R.; Dwek, R. A.; Platt, F. M. Molecular requirements of imino sugars for the selective control of N-linked glycosylation and glycosphingolipid biosynthesis. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, 11, 113-124.
62. Platt, F. M.; Neises, G. R.; Karlsson, G. B.; Dwek, R. A.; Butters, T. D. N-butyldeoxygalactonojirimycin inhibits glycolipid biosynthesis but does not affect N-linked oligosaccharide processing. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 27108-27114.
63. Wennekes, T.; van den Berg, R. J. B. H. N.; Bongers, K. M.; Donker-Koopman, W. E.; Ghisaidoobe, A.; van der Marel, G. A.; Strijland, A.; Aerts, J. M. F. G.; Overkleeft, H. S. Synthesis and evaluation of dimeric lipophilic iminosugars as inhibitors of glucosylceramide metabolism. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 20, 836-846.
64. Faugeron, V.; Genisson, Y.; Andrieu-Abadie, N.; Colie, S.; Levade, T.; Baltas, M. C-Alkyl 5-membered ring imino sugars as new potent cytotoxic glucosylceramide synthase inhibitors. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 4437-4439.
65. Luberto, C.; Hannun, Y. A. Sphingomyelin Synthase, a Potential Regulator of Intracellular Levels of Ceramide and Diacylglycerol during SV40 Transformation: does sphingomyelin synthase account for the putative phosphatidylcholine-specific phospholipase C? *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 14550-14559.
66. Itoh, M.; Kitano, T.; Watanabe, M.; Kondo, T.; Yabu, T.; Taguchi, Y.; Iwai, K.; Tashima, M.; Uchiyama, T.; Okazaki, T. Possible Role of Ceramide as an Indicator of Chemoresistance: Decrease of

the Ceramide Content via Activation of Glucosylceramide Synthase and Sphingomyelin Synthase in Chemoresistant Leukemia. *Clin. Cancer Res.* **2003**, 9, 415-423.

67. Bai, A.; Meier, G. P.; Wang, Y.; Luberto, C.; Hannun, Y. A.; Zhou, D. Prodrug Modification Increases Potassium Tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]-decan-8-yl Dithiocarbonate (D609) Chemical Stability and Cytotoxicity against U937 Leukemia Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, 309, 1051-1059.
68. Deng, X.; Lin, F.; Zhang, Y.; Li, Y.; Zhou, L.; Lou, B.; Li, Y.; Dong, J.; Ding, T.; Jiang, X.; Wang, R.; Ye, D. Identification of small molecule sphingomyelin synthase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 73, 1-7.
69. Salma, Y.; Ballereau, S.; Maaliki, C.; Ladeira, S.; Andrieu-Abadie, N.; Genisson, Y. Flexible and enantioselective access to jaspine B and biologically active chain-modified analogues thereof. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 3227-3243.
70. Chandran, S.; Machamer, Carolyn E. Inactivation of ceramide transfer protein during pro-apoptotic stress by Golgi disassembly and caspase cleavage. *Biochem. J.* **2012**, 442, 391-401.
71. Charruyer, A.; Bell, S. M.; Kawano, M.; Douangpanya, S.; Yen, T.-Y.; Macher, B. A.; Kumagai, K.; Hanada, K.; Holleran, W. M.; Uchida, Y. Decreased Ceramide Transport Protein (CERT) Function Alters Sphingomyelin Production following UVB Irradiation. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 16682-16692.
72. Swanton, C.; Marani, M.; Pardo, O.; Warne, P. H.; Kelly, G.; Sahai, E.; Elustondo, F.; Chang, J.; Temple, J.; Ahmed, A. A.; Brenton, J. D.; Downward, J.; Nicke, B. Regulators of Mitotic Arrest and Ceramide Metabolism Are Determinants of Sensitivity to Paclitaxel and Other Chemotherapeutic Drugs. *Cancer Cell* **2007**, 11, 498-512.
73. Lee, A. J. X.; Roylance, R.; Sander, J.; Gorman, P.; Endesfelder, D.; Kschischo, M.; Jones, N. P.; East, P.; Nicke, B.; Spassieva, S.; Obeid, L. M.; Birkbak, N. J.; Szallasi, Z.; McKnight, N. C.; Rowan, A. J.; Speirs, V.; Hanby, A. M.; Downward, J.; Tooze, S. A.; Swanton, C. CERT depletion predicts chemotherapy benefit and mediates cytotoxic and polyploid-specific cancer cell death through autophagy induction. *J. Pathol.* **2012**, 226, 482-494.
74. Kawano, M.; Kumagai, K.; Nishijima, M.; Hanada, K. Efficient Trafficking of Ceramide from the Endoplasmic Reticulum to the Golgi Apparatus Requires a VAMP-associated Protein-interacting FFAT Motif of CERT. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 30279-30288.
75. Kumagai, K.; Kawano-Kawada, M.; Hanada, K. Phosphoregulation of the Ceramide Transport Protein CERT at Serine 315 in the Interaction with VAMP-associated Protein (VAP) for Inter-organelle Trafficking of Ceramide in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* **2014**, 289, 10748-10760.
76. Sugiki, T.; Takeuchi, K.; Yamaji, T.; Takano, T.; Tokunaga, Y.; Kumagai, K.; Hanada, K.; Takahashi, H.; Shimada, I. Structural Basis for the Golgi Association by the Pleckstrin Homology Domain of the Ceramide Trafficking Protein (CERT). *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 33706-33718.
77. Kumagai, K.; Yasuda, S.; Okemoto, K.; Nishijima, M.; Kobayashi, S.; Hanada, K. CERT Mediates Intermembrane Transfer of Various Molecular Species of Ceramides. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 6488-6495.
78. Kudo, N.; Kumagai, K.; Matsubara, R.; Kobayashi, S.; Hanada, K.; Wakatsuki, S.; Kato, R. Crystal Structures of the CERT START Domain with Inhibitors Provide Insights into the Mechanism of Ceramide Transfer. *J. Mol. Biol.* **2010**, 396, 245-251.
79. Kudo, N.; Kumagai, K.; Tomishige, N.; Yamaji, T.; Wakatsuki, S.; Nishijima, M.; Hanada, K.; Kato, R. Structural basis for specific lipid recognition by CERT responsible for nonvesicular trafficking of ceramide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, 105, 488-493.
80. Hanada, K.; Kumagai, K.; Tomishige, N.; Kawano, M. CERT and intracellular trafficking of ceramide. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids* **2007**, 1771, 644-653.

81. Kumagai, K.; Kawano, M.; Shinkai-Ouchi, F.; Nishijima, M.; Hanada, K. Interorganelle Trafficking of Ceramide Is Regulated by Phosphorylation-dependent Cooperativity between the PH and START Domains of CERT. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 17758-17766.
82. Tomishige, N.; Kumagai, K.; Kusuda, J.; Nishijima, M.; Hanada, K. Casein Kinase I γ 2 Down-Regulates Trafficking of Ceramide in the Synthesis of Sphingomyelin. *Mol. Biol. Cell* **2009**, *20*, 348-357.
83. Fugmann, T.; Hausser, A.; Schöffler, P.; Schmid, S.; Pfizenmaier, K.; Olayioye, M. A. Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramide transfer protein. *J. Cell Biol.* **2007**, *178*, 15-22.
84. Saito, S.; Matsui, H.; Kawano, M.; Kumagai, K.; Tomishige, N.; Hanada, K.; Echigo, S.; Tamura, S.; Kobayashi, T. Protein Phosphatase 2C ϵ Is an Endoplasmic Reticulum Integral Membrane Protein That Dephosphorylates the Ceramide Transport Protein CERT to Enhance Its Association with Organelle Membranes. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 6584-6593.
85. Hullin-Matsuda, F.; Tomishige, N.; Sakai, S.; Ishitsuka, R.; Ishii, K.; Makino, A.; Greimel, P.; Abe, M.; Laviad, E. L.; Lagarde, M.; Vidal, H.; Saito, T.; Osada, H.; Hanada, K.; Futerman, A. H.; Kobayashi, T. Limonoid Compounds Inhibit Sphingomyelin Biosynthesis by Preventing CERT Protein-dependent Extraction of Ceramides from the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 24397-24411.
86. Ueno, M.; Kitagawa, H.; Ishitani, H.; Yasuda, S.; Hanada, K.; Kobayashi, S. Catalytic enantioselective synthesis of a novel inhibitor of ceramide trafficking, (1*R*,3*R*)-*N*-(3-hydroxy-1-hydroxymethyl-3-phenylpropyl)dodecanamide (HPA-12). *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7863-7865.
87. Yasuda, S.; Kitagawa, H.; Ueno, M.; Ishitani, H.; Fukasawa, M.; Nishijima, M.; Kobayashi, S.; Hanada, K. A Novel Inhibitor of Ceramide Trafficking from the Endoplasmic Reticulum to the Site of Sphingomyelin Synthesis. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 43994-44002.
88. Nakamura, Y.; Matsubara, R.; Kitagawa, H.; Kobayashi, S.; Kumagai, K.; Yasuda, S.; Hanada, K. Stereoselective Synthesis and Structure-Activity Relationship of Novel Ceramide Trafficking Inhibitors. (1*R*,3*R*)-*N*-(3-Hydroxy-1-hydroxymethyl-3-phenylpropyl)dodecanamide and Its Analogues. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3688-3695.
89. Ďuriš, A.; Wiesenganger, T.; Moravčíková, D.; Baran, P.; Kožíšek, J.; Daich, A.; Berkeš, D. Expedient and Practical Synthesis of CERT-Dependent Ceramide Trafficking Inhibitor HPA-12 and Its Analogues. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1642-1645.
90. Ueno, M.; Huang, Y.-Y.; Yamano, A.; Kobayashi, S. Revised Stereochemistry of Ceramide-Trafficking Inhibitor HPA-12 by X-ray Crystallography Analysis. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2869-2871.
91. Yasuda, S.; Kitagawa, H.; Ueno, M.; Ishitani, H.; Fukasawa, M.; Nishijima, M.; Kobayashi, S.; Hanada, K. A novel inhibitor of ceramide trafficking from endoplasmic reticulum to the site of sphingomyelin synthesis. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 24162.

Chapitre II – Méthodologie d'identification d'antagonistes potentiels de la protéine CERT

I.	Modélisation moléculaire.....	46
1)	Etude structurale.....	46
a)	Collection de structures	46
b)	Alignement des structures et classification.....	47
c)	Conclusion intermédiaire	51
2)	Arrimage moléculaire	52
a)	Le processus d'arrimage moléculaire protéine-ligand	52
b)	Choix des structures	55
c)	Définition du site de liaison et des contraintes de calculs	56
d)	Analyse des résultats post-docking	57
3)	Validation préliminaire du modèle <i>in silico</i>	58
II.	Tests de reconnaissance avec CERT	64
1)	Etat de l'art.....	64
a)	Tests <i>ex vivo</i>	64
b)	Tests <i>in vitro</i>	67
2)	Test de liaison spécifique optimisé	71
3)	Conclusion intermédiaire	88
III.	Méthode d'identification de nouveaux ligands	89
1)	Corrélation <i>in silico</i> & <i>in vitro</i>	89
2)	Limites et optimisation de la méthode	91
3)	Validation de la méthode	93
IV.	Recherche de nouveaux antagonistes potentiels de CERT	106
1)	Criblage.....	106
a)	Application du filtre <i>in silico</i>	106
b)	Criblage haut-débit <i>in vitro</i>	117
2)	Conception rationnelle <i>in silico</i> et relation structure-activité	134
a)	Famille des HPAs	134
b)	Iminosucres	139
V.	Conclusion	148
	PARTIE EXPÉRIMENTALE	149
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	152

I. Modélisation moléculaire

L'objectif de ce travail était d'identifier de nouveaux ligands du domaine START de CERT comme inhibiteurs potentiels du transport du céramide par CERT plus efficaces que l'HPA-12, représentant la seule famille connue d'inhibiteurs. Nous avons appuyé cette recherche sur différentes méthodologies *in silico* (études structurales, arrimage moléculaire) et *in vitro* (test de liaison spécifique) en combinant des stratégies d'approches rationnelles et de criblage.

1) Etude structurale

Ce type d'étude est nécessaire avant la mise au point d'un processus d'arrimage moléculaire (« docking ») ou plus généralement de travaux de modélisation moléculaire. Si le volume de données cristallographiques (nombre de structures ligandées) disponibles dans les bases telles que la Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/>) est suffisant, on attendra une bonne connaissance de la dynamique (par exemple, des changements conformationnels) de la protéine et des interactions (par exemple, des relations structure-fonction) au niveau du site de liaison. Il faut donc démarrer par la constitution d'un catalogue des structures cristallines disponibles, puis les traiter avec des outils de comparaison structurales pour en faire ressortir les invariants (possibilité de définition de pharmacophores) au niveau des ligands ou du site de liaison, compiler les données (molécules d'eau, qualité des structures ...) qui seront utiles en amont pour les études d'arrimage, puis mettre en place une ligandothèque focalisée correspondant à la protéine. L'ensemble de ce travail préparatoire est généralement regroupé sous le terme « d'étude structurale ».

a) Collection de structures

Cette étude *in silico* est donc possible grâce à la disponibilité de structures RX du domaine START de la protéine sous sa forme *apo*, co-cristallisée avec des céramides de longueurs de chaînes acyles différentes (C6, C16, C18 et C24), le C10-diacylglycérol (DDR) ¹ et des analogues synthétiques du céramide inhibiteurs de la protéine CERT, les (1*R*,3*R*)-N-(3-hydroxy-1-hydroxyméthyl-3-phénylpropyl)alkanamide avec différentes longueurs de chaînes acyles (HPA-13, HPA-14, HPA-15 et HPA-16).² Certaines structures contiennent en plus de leur ligand du diméthylsulfoxyde (DMSO), utilisé comme solvant du ligand dans les cas des co-cristallisations.

L'ensemble des structures disponibles dans la base PDB du domaine START a été reporté dans le Tableau 1.

Une portion de la protéine, principalement les résidus constituant les boucles, peut être manquante sur la structure cristallographique. Les structures comportant des délétions, c'est-à-dire des résidus non cristallographiés, autour du site de liaison ne seront pas retenues dans la suite de l'étude d'arrimage moléculaire.

Tableau 1 - Collection des structures RX du domaine START de la protéine CERT issues de la base PDB

Structure PDB	Chaîne	Ligand	Résolution (Å)	Référence
2E3M	A	-	2,15	Kudo et al. 2008 ¹
2E3N	A	C6	1,40	
2E3O	A	C16 + DMSO	1,55	
2E3P	A	C16	1,40	
	B	C16		
2E3Q	A	C18 + DMSO	2,08	
2E3R	A	C18	1,65	
	B	C18		
2E3S	A	C24	1,94	
2Z9Y	A	DDR	1,80	
2Z9Z*	A	DDR	1,74	
3H3Q	A	HPA-13	2,00	Kudo et al. 2010 ²
	B	HPA-13		
3H3R	A	HPA-14	1,85	
	B	HPA-14		
3H3S	A	HPA-15	1,66	
	B	HPA-15		
3H3T	A	HPA-16	2,40	
	B	HPA-16		

* mutation de Asn504 en Ala504 pour la structure 2Z9Z

b) Alignement des structures et classification

Certaines structures du domaine START de CERT issues de la PDB ont été cristallisées (unité asymétrique) sous forme multimères, dimères le plus souvent, qui comprennent deux chaînes polypeptidiques, identifiées par une lettre A et B. Chacune de ces chaînes constitue une unité fonctionnelle incluant le site de liaison du domaine START. Chaque chaîne est séparée en utilisant le programme Accelrys Discovery Studio Visualizer (cf. PARTIE EXPERIMENTALE). Ainsi pour un complexe dimérique, 2E3P par exemple, chaque sous-unité sera représentée par 2E3Pa et 2E3Pb. L'intégrité de l'ensemble des chaînes protéiques, principalement autour du site de liaison, est ensuite contrôlée en visualisant chaque sous-unité en 3D avec les logiciels Accelrys et UCSF Chimera. Ce travail est nécessaire car la conformation (polypeptide et site de liaison) de chaque chaîne peut être différente : certaines chaînes sont ligandées, d'autres non. L'étude ne doit donc pas se limiter à la chaîne A sous risque de perdre de l'information. Aussi, chaque sous-unité est prise en compte dans le processus d'analyse structurale.

A partir de cette banque de données de sous-unités fonctionnelles, les chaînes protéiques sont alignées (cf. Figure 1) avec le logiciel UCSF Chimera dans le même espace de coordonnées cartésiennes (cf. PARTIE EXPERIMENTALE) défini par une structure donnée (2E3M dans notre cas). La figure montre que les squelettes de chaque sous-unité sont superposés. On observe un très bon alignement des hélices α et des feuillets β et une variation de conformation au niveau de la boucle $\Omega 1$. La comparaison du squelette (« backbone ») de l'ensemble des structures à celui de la

structure 2E3M par le module MatchMaker de Chimera donne une valeur de RMSD $<1\text{\AA}$, confirmant la grande similarité des structures (le RMSD, ou « Root-Mean-Square Deviation », est l'écart quadratique moyen entre la conformation cristallographique et la conformation calculée).

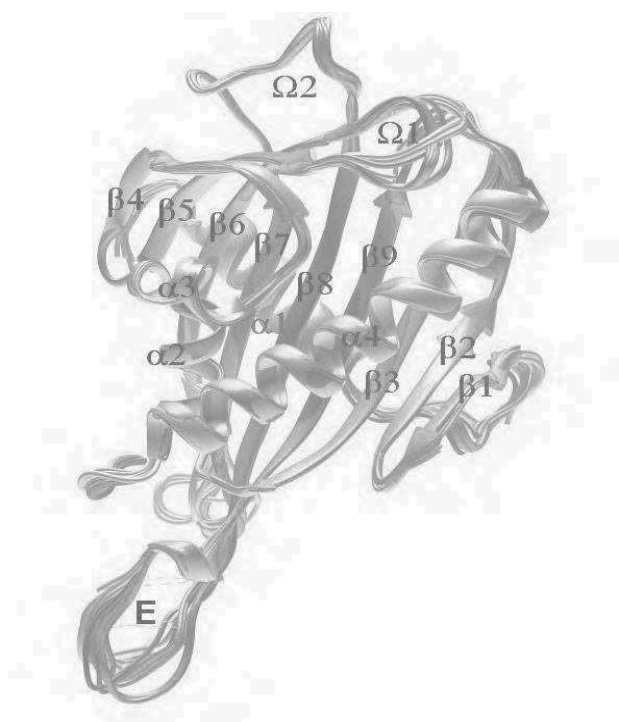


Figure 1 – Alignements des structures issues de la PBD ; en rouge : 2E3M ; en rose : 2E3N, 2E3O, 2E3Pa, 2E3Pb, 2E3Ra, 2E3Rb et 2E3S ; en gris : 2Z9Y et 2Z9Z ; en bleu : 3H3Qa, 3H3Qb, 3H3Ra, 3H3Rb, 3H3Sa, 3H3Sb, 3H3Ta et 3H3Tb.

Chaque structure possède une large cavité amphiphile, majoritairement fermée, recouverte par les hélices $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, les feuillets β et la boucle $\Omega 1$. La cavité peut contenir un seul ligand, positionné toujours au fond de la cavité (cf. Figure 2). L'hélice $\alpha 3$ et la boucles $\Omega 1$ apparaissent mobiles et leur déplacement permettrait l'entrée et la sortie du ligand.^{1, 2}

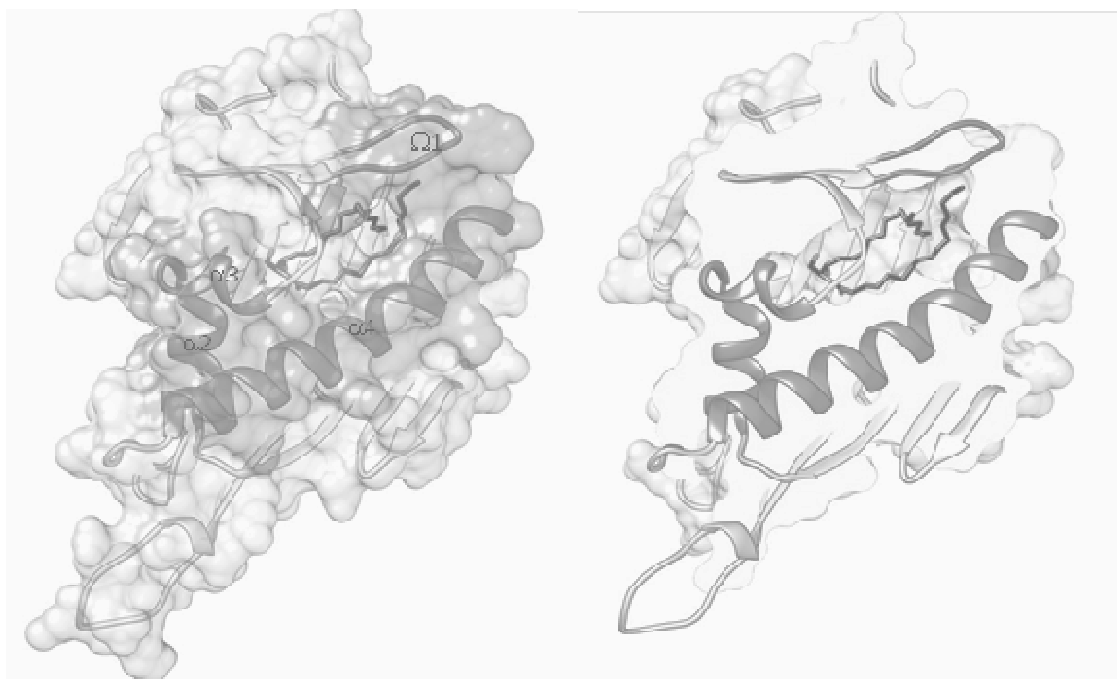


Figure 2 – Cavité amphiphile du domaine START de la protéine CERT contenant un céramide C16 (2E3Pa)

On distingue une zone hydrophobe le long de la cavité (cf. partie bleue sur la Figure 3), dans laquelle les chaînes aliphatiques du ligand développent des interactions avec les chaînes latérales hydrophobes des résidus des hélices $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ et de la boucle $\Omega 1$.

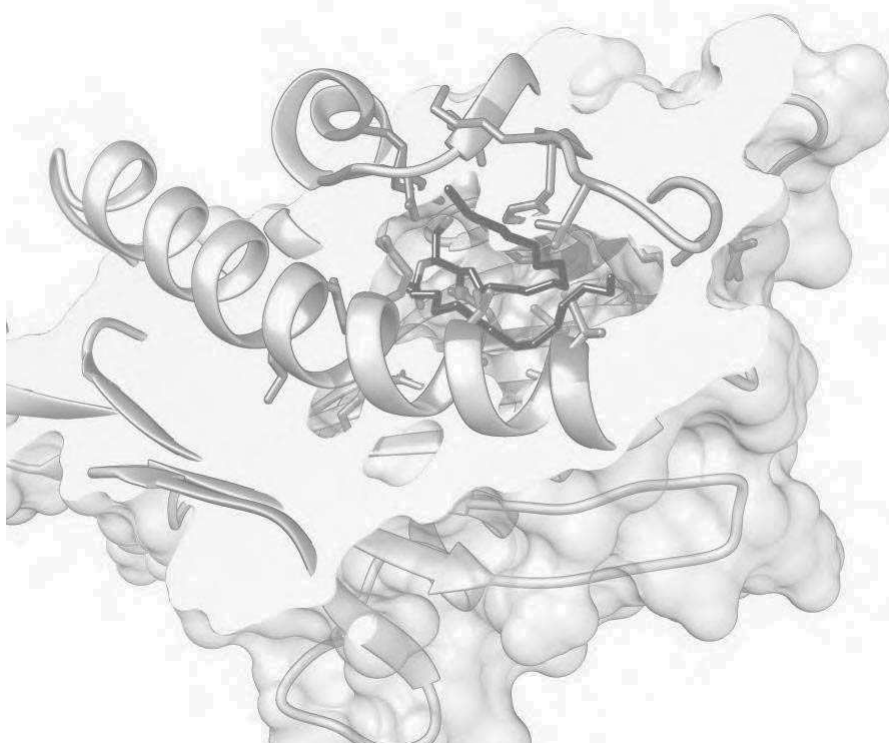


Figure 3 - Zones hydrophiles (en rouge) et hydrophobe (en bleu) dans la cavité contenant un céramide C16 (2E3Pa)

Une zone polaire est localisée au fond de la cavité co-cristallisée (cf. partie rouge sur la Figure 3), dans laquelle les groupements amide et hydroxyles des ligands développent des liaisons hydrogènes avec les résidus Glu446, Gln467, Asn504, Tyr553 et plus faiblement avec Arg442. Ces résidus sont

clés dans la reconnaissance du céramide. En effet, l'équipe de N. Kudo et R. Kato a étudié l'influence de la mutation des résidus Glu446, Gln467, Asn504, Tyr553 du domaine START sur l'activité d'extraction de céramide C16 ainsi que l'influence de ces mutations dans la totalité de CERT sur l'activité de transfert de céramide C16 par ces protéines mutantes. La mutation de Glu446 et Gln467 entraîne une diminution de 50% de l'activité d'extraction du céramide par START et une baisse de 80% de l'activité de transfert de céramide est observée pour le mutant Ala446 de CERT. La mutation de Asn504 et Tyr553 entraîne une diminution de 80 à 90% de l'activité d'extraction du céramide par START ainsi qu'une baisse de 10 à 60% de l'activité de transfert du céramide par CERT. Ce réseau spécifique de liaisons hydrogènes, et particulièrement l'interaction avec Glu446, permettrait ainsi de discriminer les céramides et ses analogues d'autres sphingolipides ou lipides à tête polaire de structure proche tel que le DDR. D'autres mutations sur les résidus His469, Ala521 et Tyr576 de CERT impliqués dans les interactions hydrophobes ont aussi entraînées une diminution de l'activité de transfert du céramide.¹ Ainsi, les deux types d'interactions, hydrophobes et hydrophiles, sont indispensables pour la reconnaissance du ligand par la protéine.

Une plus grande flexibilité est observée dans la région de la boucle $\Omega 1$, permettant différentes conformations de cette zone entre les structures apo ou co-cristallisées avec des céramides et les structures co-cristallisées avec le DDR ou les HPAs (cf. Figure 1). Le Trp473 sur la boucle $\Omega 1$ présente une orientation différente et un déplacement de 3.5Å entre les structures complexées avec des HPAs et les structures complexées avec des céramides.² La chaîne latérale indolique est orientée vers l'extérieur de la cavité dans les structures apo et co-cristallisées avec des céramides (en rose sur la Figure 4), alors qu'elle est orientée vers l'intérieur de la cavité dans les complexes avec DDR et HPAs (en gris et bleu respectivement sur la Figure 4). Ce déplacement vers l'extérieur est corrélé avec l'ouverture de la cavité entre $\Omega 1$, $\alpha 3$ et $\alpha 4$, permettant la sortie de la chaîne sphingoïde des céramides. A l'inverse, l'orientation interne du Trp473 est corrélée avec une cavité fermée (cf. Figure 4).

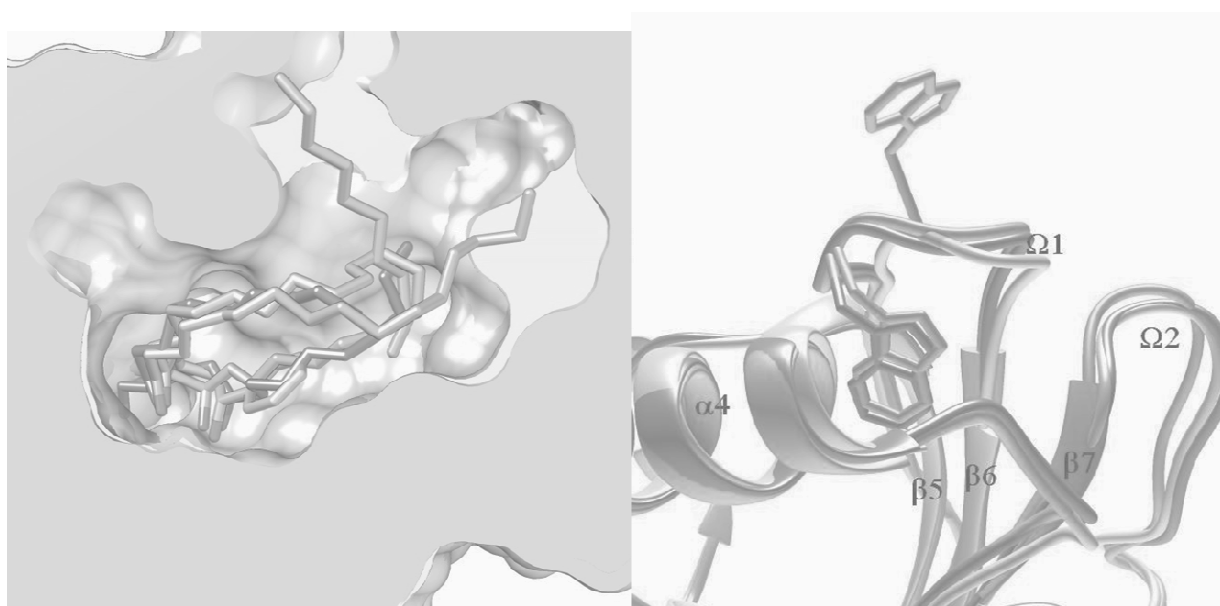


Figure 4 - Superposition des structures du domaine START complexé avec le céramide C16 (surface et squelette en rose), avec le (R,R)-HPA-16 (surface et squelette en bleu) et avec le DDR (squelette en gris).

La mutation des Trp473 et 562 du domaine START entraîne une perte totale de l'activité d'extraction et de transfert de céramide C16.¹ De même, la mutation du Trp473 par une alanine entraîne une diminution de 50% de l'affinité du domaine START avec les membranes lipidiques.² Ces résultats indiquent l'implication de ces résidus dans le mécanisme d'extraction du céramide des membranes lipidiques.

De plus, les structures ouvertes (formes apo ou complexées avec les céramides) présentent une affinité avec les membranes lipidiques 10 fois plus importante que les structures fermées (formes complexées HPAs).² Ainsi, la conformation de la boucle $\Omega 1$, et plus particulièrement la conformation du Trp473, influencent l'activité d'extraction du céramide de la protéine. R. Kato et ses collaborateurs utilisent ces résultats pour proposer un mécanisme d'inhibition des HPAs. L'équipe suggère que la courbure de la chaîne alkanamide des HPAs au sein de la cavité provoquerait un déplacement du Trp473 vers l'intérieur. L'affinité du complexe START-HPA avec les membranes lipidiques serait alors diminuée, limitant l'échange de molécules (extraction ou relargage) avec les membranes lipidiques. La protéine perdrait alors son activité d'extraction du céramide.

Bien que l'orientation interne du Trp473 diminue l'activité de la protéine, son déplacement ne peut être attribué à l'orientation de la chaîne alkanamide des HPAs. En effet, cette conformation du Trp473 est aussi observée dans la structure co-cristallisée avec le DDR, dans laquelle la chaîne acyle du DDR reste étendue au fond de la cavité tout comme celles des céramides. L'origine du déplacement de la boucle $\Omega 1$ et du Trp473 reste à élucider dans les complexes START-DDR et START-HPAs.

Ainsi deux interrogations persistent sur ces changements conformationnels en lien avec l'identification de nouveaux ligands :

- d'une part, sur le mécanisme précis d'entrée et de sortie d'un ligand dans la cavité de la protéine (lié à la flexibilité de $\Omega 1$ et $\alpha 3$)
- d'autre part, sur une possible corrélation entre la forme ouverte (ou fermée) de la cavité, notamment en lien avec le changement de position du Trp473, et l'action inhibitrice d'un ligand.

c) Conclusion intermédiaire

Cette étude structurale a permis d'identifier deux paramètres clés dans l'identification de ligands, antagonistes potentiels de la protéine CERT.

- Bien évidemment, le ligand doit être reconnu par le domaine START. Cette reconnaissance est basée sur les interactions hydrophobes et hydrophiles développées par le céramide avec la poche de liaison amphiphile.
- Mais le ligand devrait aussi déplacer le Trp473 vers l'intérieur de la cavité pour entraîner une diminution de l'activité d'extraction du céramide par la protéine.

2) Arrimage moléculaire

Notre approche, appelée « Structure-Based Drug Design », est basée sur une conception par dérivation du ligand naturel ou de la famille des HPAs, seuls antagonistes connus à ce jour, puis à leur sélection (par classement selon un critère d'affinité théorique) au moyen de calculs d'arrimage moléculaire protéine-ligand.

a) Le processus d'arrimage moléculaire protéine-ligand

L'arrimage moléculaire, correspondant au «docking», «clustering» et «scoring», a pour objectif, de manière plus ou moins combinée selon les logiciels de : i) produire (« docking ») des conformations de complexes protéine-ligand; ii) de sélectionner (« clustering ») par classification des conformations représentatives; iii) de hiérarchiser les conformations au moyen d'un score d'affinité (« scoring »).

En ce qui concerne la flexibilité, ce type de méthode peut être classé selon 4 approches, présentées par ordre de complexité croissante :

- *Ligands et protéine non flexibles.*
- *Ligand flexibles et protéine non flexible .*
- *Ligands flexibles et flexibilité locale de la protéine.* Dans ce cas, le squelette de la protéine est généralement fixe, mais les chaînes latérales des résidus autour du site de liaison sont flexibilisées. Des étapes de minimisations ou l'autorisation des recouvrements stériques pendant le calcul, peuvent être utilisés pour émuler la flexibilité. Nous utiliserons une approche correspondant à ce niveau de complexité dans ce travail.
- *Ligands flexibles et flexibilité générale de la protéine.* Dans ce cas, les changements conformationnels au niveau de la protéine peuvent être pris en compte et échantillonnés (docking 4D, ensemble docking ³...) ou simulés (par exemple par dynamique moléculaire) au moyen de différentes méthodes calculatoires.

La fonction de score est une brique essentielle de ces processus. Ces fonctions sont conçues de manière à corréliser le score, tel que XScore⁴ ou DrugScore,^{5,6} (produit à partir de structures calculées de complexes protéine-ligand) avec une valeur expérimentale (par exemple une énergie de liaison, une constante d'équilibre d'association-dissociation ...) pour un jeu de données tests.^{7,8} Lorsque cette phase de paramétrage abouti, on attend du score minimal qu'il corresponde à la conformation du ligand maximisant les interactions avec la protéine. Plus précisément, cette conformation du complexe protéine-ligand, sera de nature à rendre compte d'une meilleure affinité ou d'un niveau d'activité donné (par exemple un pourcentage d'inhibition) du ligand.

Près d'une centaine de fonctions de score sont disponibles que l'on peut regrouper en différentes catégories (dérivées d'un champ de force, basées sur des connaissances, empiriques ...). Certaines sont dérivées les unes des autres (dites dégénérées), certaines ne sont plus utilisables (perte des algorithmes, manque de documentation, dépendantes de formats de données obsolètes, non implémentées sur la plateforme de calcul ...).⁹ Dans la pratique, une à trois fonctions de scores sont utilisées dans un calcul d'arrimage.

Le processus global d'arrimage se déroule en quatre étapes principales :

- 1) Une étape en amont du processus d'arrimage, qui consiste à définir le site de liaison (choix des résidus impliqués, flexibilité des résidus, contraintes ...) et à préparer les ligands (validation des structures chimiques : charges, hybridations, géométries).
- 2) Une étape de production de complexes protéines-ligands au moyen de différents algorithmes qui permettent à la fois de générer des conformations de complexes et de les faire évoluer en utilisant une fonction de score que l'on cherchera à minimiser. A titre d'exemple, des algorithmes évolutionnaires ont été utilisés pour cette étude. Une population d'individus est initiée avec une probabilité équivalente pour chaque individu. Après évaluation de la population initiale, les individus les plus performants sont sélectionnés (parents), puis soumis à des variations (mutation et croisement). Les enfants sont évalués, puis la population la plus adaptée est sélectionnée jusqu'à trouver l'individu le plus performant ou après atteinte du nombre maximal de générations. La phase de classement (« clustering ») intervient également à ce niveau en produisant un nombre fini (au moyen de différents algorithmes) de structures représentatives de conformations de complexes possibles, appelées poses.
- 3) Une autre étape peut s'ajouter au processus d'arrimage et peut être complétée par des calculs intermédiaires tels que la minimisation énergétique d'un complexe, un calcul d'affinité en utilisant d'autres fonctions de scores (externes au logiciel d'arrimage) ou encore un calcul de dynamique moléculaire. Dans ce cas on disposera de scores avant ou après minimisation ou d'évaluations de l'énergie d'interaction.
- 4) Enfin, intervient une étape d'analyse de la conformation des poses et des valeurs de scores. Il s'agit souvent d'évaluer les résultats en termes :
 - i) d'efficacité : valeur des scores, croisements entre scores;
 - ii) de conformité : reproduction des poses cristallographiques, reproduction de positions-orientations ou interactions connues et nécessaires à l'activité biologique;
 - iii) d'efficience : combinaison avec d'autres grandeurs, telles que des descripteurs chimiques (LogP, nombre d'atomes lourds (C, N, O) ... pour normaliser les résultats).

Ce type d'évaluation implique une analyse visuelle des poses et une évaluation de l'écart tel que le RMSD lorsqu'on s'intéresse à la reproduction de conformation cristallographique afin de valider le processus d'arrimage.

Ce processus est représenté schématiquement dans la Figure 5 ci-dessous.

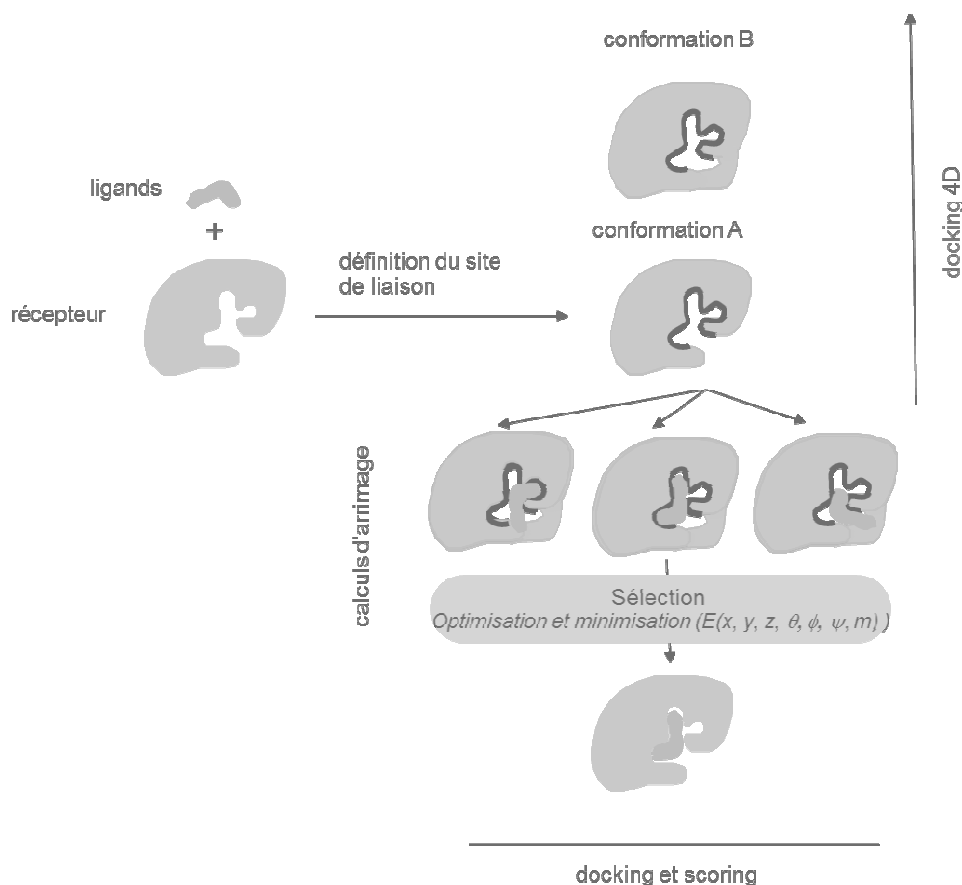


Figure 5 - Processus global d'arrimage moléculaire (« docking » et « scoring »)

Le logiciel « Molegro Virtual Docker » (MVD) a été sélectionné pour les calculs d'arrimage moléculaire, du fait de sa disponibilité au laboratoire, son interface utilisateur conviviale et la possibilité d'un paramétrage fin à tous les niveaux du processus (« docking », « scoring », flexibilité des résidus et ligands modulable, « template docking » ou définition d'un patron pharmacophorique ...), limitant l'aspect « boîte noire ». Compte tenu du système étudié (ligands amphiphiles associant une tête polaire chirale comprenant deux centres asymétriques à une longue région hydrophobe au sein d'une poche de liaison au volume important) la possibilité de pouvoir manipuler une trentaine de paramètres de calcul de manière à produire la modélisation la plus fine possible était impérative.

Dans ce travail la fonction de score MolDock (E_{total}) a été utilisée.¹⁰ Elle est définie comme la somme des énergies d'interactions intermoléculaires ligand-protéine E_{inter} et des énergies intramoléculaires du ligand E_{intra} :

$$E_{score} = E_{inter} + E_{intra} \quad (\text{éq.1})$$

Chaque contribution se décline également en sous-contributions (qui restent accessibles dans les résultats) dépendantes de différentes grandeurs physiques telles que interactions hydrogènes, de Van der Waals, contraintes stériques, de torsions ...

Une étude comparative de différents algorithmes a montré que MolDock est capable d'identifier le bon mode de liaison de ligand dans 87% des complexes évalués, devant Glide,¹¹ GOLD,¹² FlexX¹³ et Surflex.¹⁴ Cette évaluation s'est appuyée sur la mesure des RMSD entre les poses calculées et

cristallographiées pour 77 complexes protéine-ligand.¹⁰ Ces résultats sont à modérer dans la mesure où chaque communauté scientifique défend son système de score. Dans la pratique, les résultats de plusieurs scores sont croisés. Si pour une série de poses, les meilleures poses selon un premier score (*MolDock* par exemple) correspondent aux meilleures poses obtenues avec d'autres scores, on parlera alors de « pose forte ». Si une pose forte s'avère correspondre aux critères de conformité par ailleurs définis à partir de l'analyse structurale (par exemple, la reproduction d'une conformation du ligand et d'un réseau d'interactions), on parlera alors de « pose forte et conforme », qui sera retenue comme étant représentative pour le ligand d'intérêt. Si on choisit de retenir les deux premières poses fortes, si possible conformes, et que ces poses convergent en termes de valeurs de scores/conformité, tout en étant issues de calculs (« runs ») d'arrimage indépendants, les résultats seront renforcés pour le ligand d'intérêt. On entrevoit ici tout le protocole post-arrimage qu'il est possible de mettre en place (Cf. partie I)d) du chapitre pour plus de détails) pour réduire la masse de résultats et la rendre plus lisible. En effet, le processus d'arrimage produit plusieurs dizaines ou centaines de milliers de conformations qui peuvent être issues de plusieurs cycles de calcul par ligand avec des paramètres différents. Après classification, ce jeu de données peut être réduit. Un processus d'analyse avec une priorité conformité-efficacité qui peut être différente selon le cas, est très important. Il devra être appliqué d'une manière standardisée sur l'ensemble de la ligandothèque en étant attentif à tous les éléments subjectifs qui pourraient induire des biais.

b) Choix des structures

L'analyse structurale a permis d'identifier des structures du domaine START avec une cavité ouverte et des structures avec une cavité fermée. Le choix de la structure est une étape fondamentale du processus d'arrimage dans le sens où la topologie d'un site de liaison va induire des solutions quant à l'arrimage, surtout si un processus d'adaptation induite de la protéine par rapport au ligand est possible. Dans ce cas, on risque d'avoir une topologie de site correspondant à un ligand en particulier. L'utilisation de la flexibilité des chaînes latérales permet en partie de diminuer cet effet quand une très grande similarité du squelette de la protéine est observée. Mais la flexibilité tend aussi à moyenniser les résultats ce qui complique les analyses en aval de l'arrimage moléculaire et fait perdre de la sensibilité par rapport à un ligand donné.

Une solution intermédiaire est de réaliser les calculs sur chaque classe de site ainsi définis par leur topologie et le type de ligand complexé, ce qui augmente le nombre de calculs mais diminue les risques liés à un choix biaisé de structure par rapport à une catégorie de ligands donnée. D'autre part, lorsque la structure chimique des ligands devient très différente de celle des ligands co-cristallisés, cette approche (« ensemble docking » ou « docking 4D »³) devient également intéressante pour évaluer la corrélation avec un changement conformationnel au niveau de la protéine.

Dans notre cas, 4 structures ont été retenues pour les calculs d'arrimages, dont 2 structures ouvertes (2E3N et 2E3Pa) et 2 structures fermées (2Z9Z et 3H3Tb). Les structures 2E3N et 2E3Pa contiennent une molécule d'eau à proximité de la tête polaire des céramides co-cristallisés pouvant intervenir dans le réseau de liaison hydrogène.¹

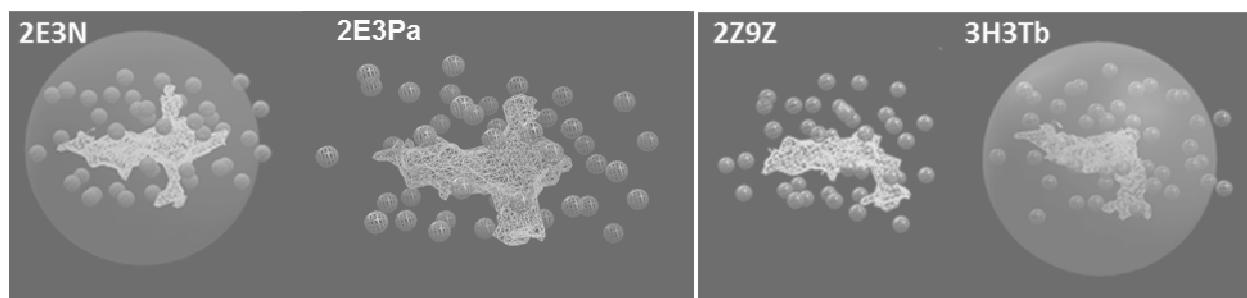


Figure 6 - Cavité des structures 2E3N, 2E3Pa, 2Z9Z et 3H3Tb

Les optimisations de la méthode d'arrimage ont été réalisées sur ces 4 structures en tenant compte ou non de la molécule d'eau¹⁵ pendant le calcul. Toutes ces alternatives ont conduit aux mêmes résultats. Dans le cas précis de la CERT, le docking 4D, en mode flexible, ne semble pas apporter une information supplémentaire. Ce résultat pouvait être suspecté puisque la zone du site liant la tête polaire des céramides (au travers d'un réseau de liaisons hydrogène) subit peu de fluctuation. De ce fait, seule la structure 2E3Pa a été conservée comme structure canonique pour la suite de l'étude.

c) Définition du site de liaison et des contraintes de calculs

Le site de liaison est défini par une sphère de recherche (en vert) d'un rayon de 15Å englobant la cavité amphiphile (surface hachurée en vert), les ligands et les acides aminés autour de la cavité en interaction avec les ligands (sphères grises) (cf. Figure 7).

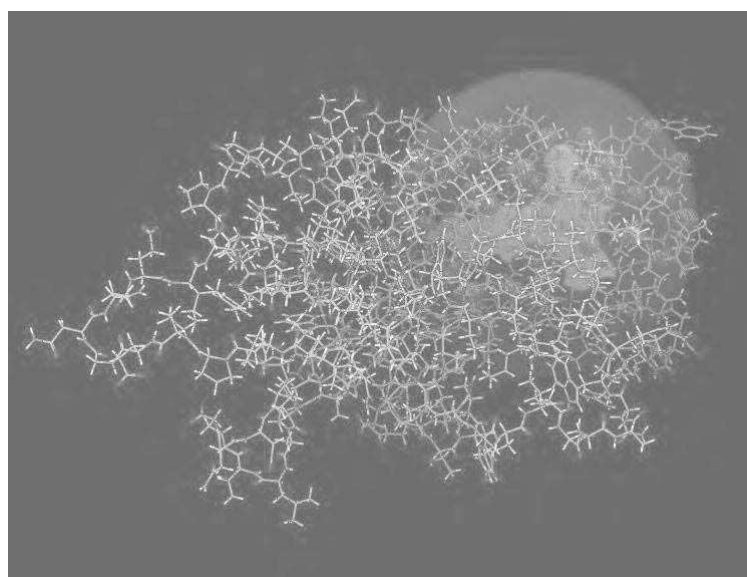


Figure 7 - Site de liaison de la protéine 2E3Pa

La sélection des résidus composant le site de liaison est critique car elle oriente les calculs et les résultats de l'arrimage. Seuls les acides aminés en interaction avec les ligands co-cristallisés ont été sélectionnés. Le site de liaison est ainsi constitué des 42 résidus suivants : Phe436, Arg442, Trp445, Glu446, Thr447, Thr448, Ile449, Ile465, Gln467, Thr468, His469, Lys470, Arg471, Val472, Trp473, Pro474, Ala475, Ser476, Gln477, Arg478, Val480, Tyr482, Asn504, Ala521, Ile523, Val525, Tyr553, Ala555, Val557, Pro559, Trp562, Ala563, Pro564, Val567, Leu568, Val571, Ala572, Arg574, Glu575, Tyr576, Lys578 et Phe579.

Afin de rendre l'arrimage moléculaire plus réaliste dans la modélisation de la reconnaissance ligand-protéine, les ligands et les résidus constituant le site de liaison sont définis flexibles.

L'analyse structurale a mis en évidence la superposition des têtes polaires et chaînes lipidiques des ligands céramides, diacylglycérol et HPAs dans la cavité, ainsi que des interactions hydrophiles et hydrophobes clés pour la reconnaissance. Ainsi, le calcul tendra à reproduire la géométrie et les interactions de ces ligands. La définition d'un *profil pharmacophorique*, selon la terminologie du développeur du logiciel MVD, permet de contraindre le calcul pour favoriser le positionnement d'un type d'atome tels que accepteur d'hydrogène, donneur d'hydrogène, stérique ou cyclique, avec une force de contrainte pondérée.¹⁶ Cette contrainte, bien que nécessaire, doit rester faible pour ne pas introduire un biais dans le calcul et préserver les possibilités d'obtenir des conformations différentes. Une étape de minimisation du complexe domaine START-ligand après calcul, permet également de limiter l'impact du profil pharmacophorique.

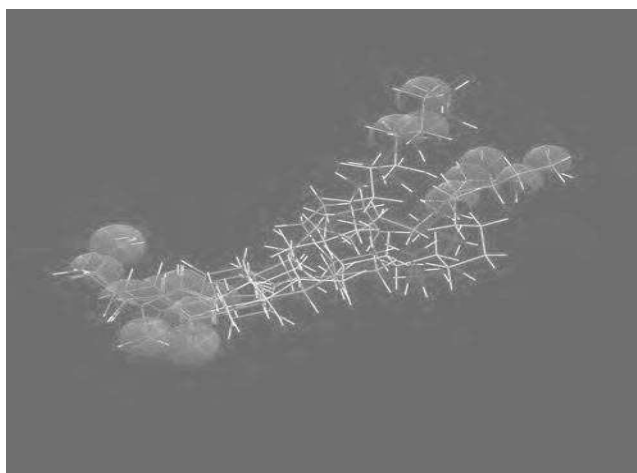


Figure 8 – Superposition des ligands cristallographiés et profil pharmacophorique utilisé dans la méthode d'arrimage moléculaire

Le profil pharmacophorique est défini par l'application d'une contrainte sur les atomes au niveau de la tête polaire du céramide et en bout des chaînes aliphatiques, avec un volume sphérique des atomes contraints fixé à 1.8Å (cf. Figure 8). On distingue 3 types de contraintes : les contraintes stériques (sphères grises, correspondant aux carbones, avec une pondération d'un facteur 0.5), les atomes donneurs d'hydrogènes (sphères roses, correspondant à l'azote et aux oxygènes, avec une pondération d'un facteur 3) et les atomes accepteurs d'hydrogènes (sphères vertes, correspondant aux oxygènes, avec une pondération d'un facteur 3).

d) Analyse des résultats post-docking

Les paramètres de calculs, indépendants entre eux, sont choisis pour leur capacité à reproduire la pose cristallographique des ligands. Deux scores basés sur des contributions énergétiques ont été sélectionnés pour l'analyse des résultats de calculs, *MolDock* et *Rerank*, ainsi que le *RMSD*. Le score *Similarity*, issu du profil pharmacophorique, n'est pas pris en compte dans cette étude car il est difficile à interpréter (la contribution des chaînes acyles des différents ligands sera trop importante vis-à-vis de la tête polaire et ne reflètera pas la conformité d'une pose calculée).

Le score *MolDock*, exprimé en unité arbitraire, correspond à une composante énergétique calculée (cf. **éq.1**) avant et après minimisation. Le score *Rerank*, aussi exprimé en unité arbitraire, correspond à une repondération des composantes du score *MolDock* et est sensé mieux reproduire les corrélations entre affinités expérimentales et affinités calculées obtenues à partir de jeux tests de complexes protéine-ligand.

Le filtre *in silico* est basé sur les règles suivantes :

- Les poses présentant les meilleurs scores *MolDock* et *Rerank* sont sélectionnées (valeur négative la plus faible). Cette sélection correspond à environ 20% de la totalité des poses.
- Chaque pose est analysée visuellement de façon individuelle et les *poses conformes* sont sélectionnées. La conformité d'une pose est définie par la similarité avec des structures cristallines de complexes céramide-domaine START au niveau de i) la disposition de la tête polaire du ligand et ii) la trajectoire des chaînes aliphatiques. En effet, les chaînes aliphatiques ne se positionnent pas de façon aléatoire dans le site, mais progressent le long de trajectoires au nombre limité.
- Lorsqu'une pose correspond à la fois au meilleur score *MolDock* et au meilleur score *Rerank*, elle est considérée comme *pose forte*.
- Si la *pose forte* est *conforme*, la *pose retenue* est aussi notée *pose limite*. Dans le cas contraire, si la *pose forte* n'est pas conforme, la *pose retenue* correspond à la *pose conforme* ayant les meilleurs scores *MolDock* et *Rerank*. Ce descripteur, *pose limite* ou *retenue*, est corrélé avec de bonnes valeurs de RMSD ($< 2\text{\AA}$). Ce niveau d'écart peut sembler élevé, notamment avec des ligands hétérocycliques avec peu d'angles de torsions, où la limite est souvent inférieure à 1\AA . Dans notre cas, les fluctuations induites par les chaînes aliphatiques en C14-C18 des ligands ne permettent pas d'atteindre ce dernier objectif.

3) Validation préliminaire du modèle *in silico*

Le filtre *in silico*, défini par le processus d'arrimage et les analyses liées à la sélection d'une pose représentative, est appliqué aux ligands co-cristallisés dans le but de reproduire la conformation du ligand dans le site de liaison.

Les tableaux suivants évaluent la modélisation dans le cas des céramides C6, C16 et C18 (Tableau 2, Figure 9), du diacyglycérol (Tableau 3, Figure 10) et des HPA-13 et HPA-16 (Tableau 4, Figure 11). Chaque tableau est associé à des figures qui permettent de comparer les *poses retenues* (efficacité, conformité) avec la conformation du même ligand lié au sein de co-structures cristallographiques.

Chaque tableau comporte les poses sélectionnées qui correspondent aux meilleurs scores *MolDock* et *Rerank*. Les *poses fortes*, ayant le meilleur score *MolDock* et le meilleur score *Rerank*, ont leurs scores écrits en rouge. Les *poses conformes* sont surlignées en vert. Les *poses limites* sont ainsi identifiées par la combinaison d'une *pose conforme* surlignée en vert et d'une *pose forte* dont les scores sont écrits en rouge. Dans le cas où la *pose forte* n'est pas conforme, la *pose retenue* est la *pose conforme* présentant les meilleurs scores. Cette pose est alors visualisée par des scores écrits en orange dans le tableau. La *pose retenue* est encadrée en gras dans les tableaux. Dans les figures, les *poses limites* ou les *poses retenues* des ligands (poses vertes) sont superposées aux poses cristallographiques (poses grises).

Tableau 2 – Reproduction de la cristallographie des ligands céramides C6, C16 et C18

Pose	MolDock	Rerank	RMSD
[09]C6	-174.888	-143.352	5.10
[07]C6	-174.295	-133.908	4.92
[13]C6	-172.639	-127.321	5.42
[19]C6	-172.317	-132.402	1.81
[19]C6	-170.961	-131.897	2.26
[10]C6	-169.546	-124.426	4.77
[04]C6	-167.428	-125.683	2.61
[01]C6	-166.024	-128.039	5.91
[05]C6	-165.069	-131.716	6.24
[11]C6	-165.019	-111.239	5.76
[19]C6	-164.459	-101.454	5.49
[07]C6	-164.153	-128.179	1.04
[09]C6	-162.763	-116.887	4.02
[16]C6	-162.002	-125.753	5.70
[18]C6	-161.64	-133.162	5.92
[11]C6	-159.933	-115.783	5.08
[06]C16	-213,255	-155,843	3,78
[12]C16	-209,529	-146,761	4,55
[09]C16	-208,869	-151,865	4,46
[19]C16	-206,146	-157,601	4,58
[02]C16	-206,146	-155,653	4,25
[00]C16	-205,797	-156,729	1,74
[07]C16	-202,189	-149,668	4,04
[16]C16	-200,531	-146,238	3,19
[04]C16	-195,955	-142,742	3,53
[08]C16	-172,898	-127,32	3,29
[14]C16	-169,531	-112,945	4,49
[19]C18	-214,359	-144,086	5,75
[04]C18	-213,044	-136,282	6,8
[00]C18	-212,957	-143,727	2,39
[17]C18	-203,543	-133,993	9,78

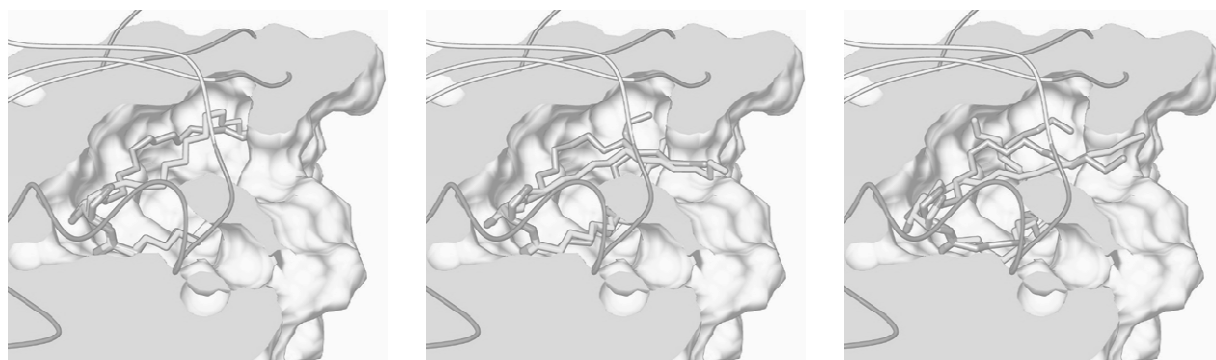


Figure 9 - Superposition des poses cristallographiques (en gris) et des poses calculées retenues (en vert) des céramides C6 (à gauche), C16 (au milieu) et C18 (à droite)

Tableau 3 - Reproduction de la cristallographie du ligand diacylglycérol DDR

Pose	MolDock	Rerank	RMSD
[42]DDR	-174,239	-136,102	7,39
[03]DDR	-171,811	-132,584	5,34
[46]DDR	-170,061	-129,29	6,49
[16]DDR	-169,235	-125,983	5,49
[06]DDR	-168,032	-69,6082	7,04
[00]DDR	-166,582	-126,471	4,28
[07]DDR	-164,231	-125,287	5,16
[07]DDR	-163,825	-99,6882	6,12
[05]DDR	-162,903	-117,577	4,39
[21]DDR	-161,937	-121,594	1,02
[01]DDR	-161,553	-98,4991	4,51
[03]DDR	-161,012	-118,385	5,03
[03]DDR	-160,551	-115,526	4,53
[01]DDR	-160,003	-123,677	5,54
[17]DDR	-159,911	-123,049	4,83
[37]DDR	-159,601	-123,209	5,76
[16]DDR	-159,284	-123,058	6,31
[02]DDR	-158,844	-122,025	5,91
[08]DDR	-158,315	-126,102	5,42
[06]DDR	-157,801	-122,787	4,42
[13]DDR	-157,595	-123,97	5,08
[19]DDR	-157,486	-106,99	6,14
[02]DDR	-157,182	-123,136	4,23
[14]DDR	-151,517	-118,727	1,16

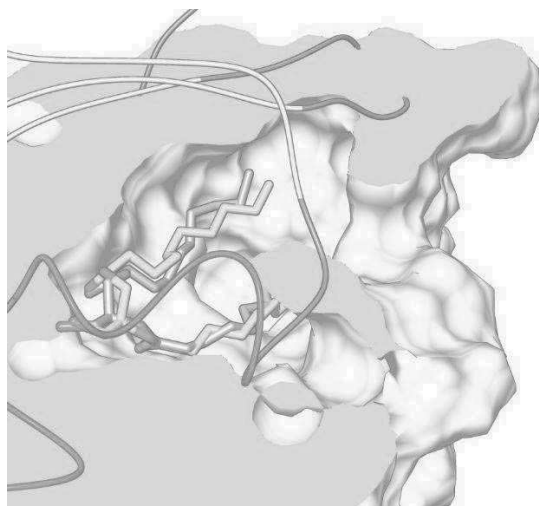


Figure 10 - Superposition de la pose cristallographique (en gris) et de la pose calculée retenue (en vert) du diacylglycérol

Tableau 4 – Reproduction de la cristallographie des ligands HPA-13 et HPA-16

Pose	MolDock	Rerank	RMSD
[10]H13	-169,05	-132,439	1,80
[16]H13	-158,125	-125,334	2,67
[02]H13	-153,085	-118,107	0,79
[19]H13	-152,103	-118,582	1,39
[04]H13	-150,41	-105,895	2,13
[12]H13	-149,493	-117,297	1,06
[14]H13	-147,311	-110,703	2,69
[06]H13	-146,365	-115,509	2,30
[09]H16	-165,83	-130,608	2,64
[00]H16	-165,635	-125,382	1,10
[12]H16	-164,125	-125,989	1,88
[11]H16	-163,154	-125,862	3,12

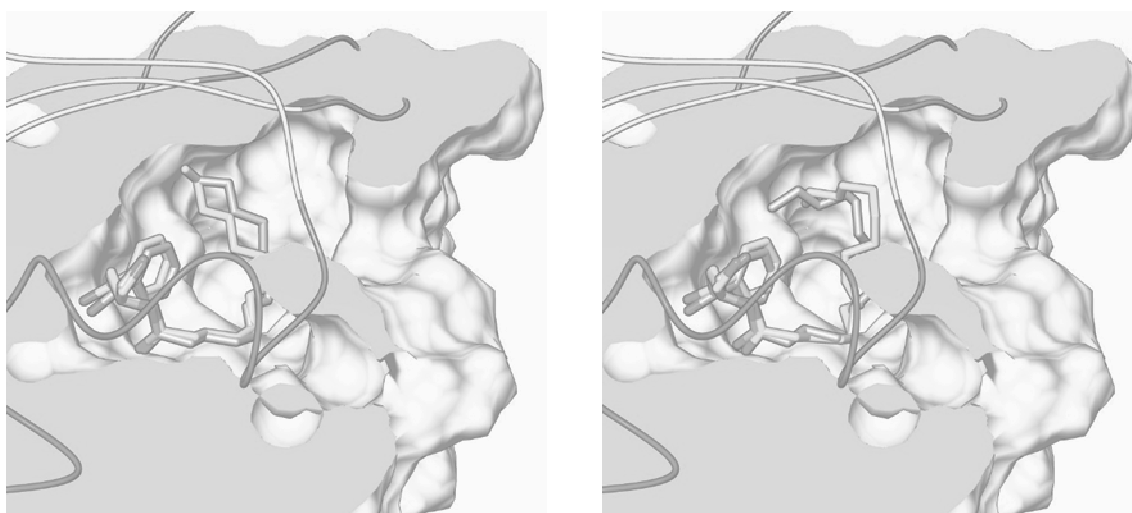


Figure 11 - Superposition des poses cristallographiques (en gris) et des poses calculées retenues (en vert) des HPA-13 (à gauche) et HPA-16 (à droite)

Dans le cas de ces trois types de ligands, les conformations calculées apparaissent très proches des poses cristallographiques. On observe une bonne superposition des têtes polaires et une bonne orientation des chaînes lipidiques, ce qui explique les faibles valeurs de RMSD : 1.81Å, 1.74Å, 1.02Å, 0.79Å et 1.10Å pour les ligands céramides C6 et C16, diacylglycérol, HPA-13 et HPA-16 respectivement, à l'exception du céramide C18 (RMSD = 2.39Å). Les valeurs plus élevées de RMSD, (> 2Å) pour des *poses conformes* peuvent s'expliquer par la grande flexibilité des chaînes aliphatiques, comportant notamment un nombre élevé de liaisons rotatives.

L'analyse détaillée des *poses retenues* permet d'évaluer plus finement la méthode d'arrimage. Les poses calculées retenues reproduisent les interactions hydrophobes le long des chaînes aliphatiques et le réseau de liaisons hydrogènes développé autour de la tête polaire des ligands co-cristallisés,^{1, 2} primordial dans la liaison au domaine START (cf. Figure 12).

Ces essais d'arrimage moléculaire mettent en évidence la bonne capacité de cette méthode à reproduire les conformations cristallographiques des ligands et les interactions développées au sein de la poche de liaison du domaine START, en particulier la liaison hydrogène clés entre l'azote de l'amide des ligands céramide et HPAs et le carboxylate de Glu446. Cette fidélité des poses calculées aux données expérimentales permet une validation préliminaire du filtre *in silico* développé.

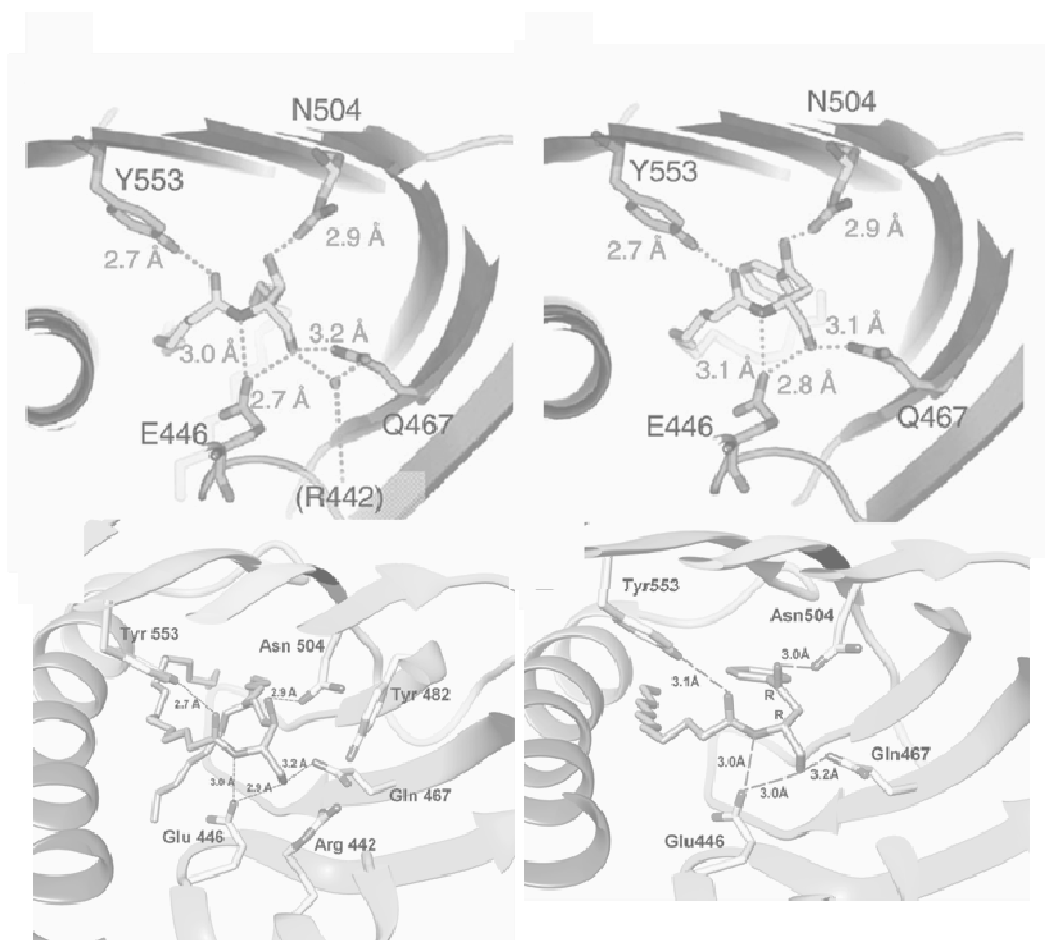


Figure 12 - Reproduction du réseau de liaisons hydrogènes du céramide C16 (à gauche) et du (1R,3R)-HPAs (à droite), en haut, poses cristallographiques issues de Kudo et al. *J. Mol. Biol.* 2010, 396, 245-251;² en bas, poses calculées

Malgré la capacité de reproduction des poses des ligands co-cristallisés, ce critère n'est pas suffisant pour évaluer la justesse de la méthode. Pour apprécier la justesse d'un modèle *in silico*, la méthode de calcul doit être capable de reproduire les poses cristallographiques et de prédire l'affinité ou l'absence d'affinité d'une molécule avec la protéine au travers des scores calculés. Ainsi, afin de valider la capacité de prédiction de la méthode développée, les scores obtenus doivent être corrélés à des valeurs expérimentales (*in vitro* ou *ex vivo*) de liaison avec la protéine CERT ou avec son domaine START.

II. Tests de reconnaissance avec CERT

1) Etat de l'art

Quelques tests permettant de quantifier l'interaction de ligands avec la protéine CERT, ou son domaine START, que ce soit en termes de reconnaissance ou d'inhibition, sont disponibles à ce jour. Ces tests peuvent être classés en deux catégories : essais *ex vivo* et essais *in vitro*. Ils seront présentés par ordre chronologique.

a) Tests *ex vivo*

Deux lignées cellulaires sont utilisées pour les essais *ex vivo* : les CHO (cellules ovariennes d'hamster chinois) et les LY-A (cellules mutantes de CHO déficientes pour la synthèse *de novo* de SM).¹⁷ Hanada a démontré que la déficience en synthèse de SM des cellules LY-A était due à un défaut de transport ATP-dépendant du céramide.¹⁸ Ce défaut de transport du céramide a par la suite été attribué à une mutation de la protéine CERT dans les cellules LY-A, rendant la protéine non fonctionnelle.¹⁹ Parmi les essais *ex vivo* existants, on distingue deux types de marquages permettant d'observer et d'évaluer la conversion de céramide en sphingomyéline via le transport du céramide par la protéine CERT.

Le premier type est un marquage fluorescent du céramide. Deux sondes fluorescentes du céramide, le *N*-[5-(5,7-diméthylBODIPY)-1-pentanoyl]-D-*erythro*-sphingosine (C5-DMB-Cer) et le *N*-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]-D-*erythro*-sphingosine (C6-NBD-Cer), sont disponibles commercialement (cf. Figure 13).

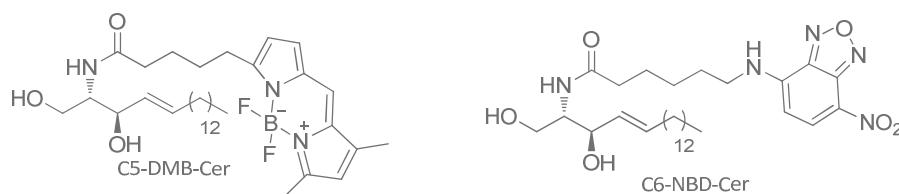


Figure 13 - Structures du C5-DMB-Cer et C6-NBD-Cer

Dès 1989, Pagano et Martin ont étudié la répartition de ces sondes dans des cellules de fibroblastes dermiques humains.^{20, 21} Ils ont mis en évidence que ces céramides fluorescents, ou leurs métabolites (SM et GlcCer), étaient internalisés dans les cellules, s'accumulaient dans l'appareil de Golgi et ne présentaient aucune cytotoxicité. La répartition de ces sondes et leur métabolisme ont été étudiés par la suite dans les cellules CHO et LY-A.^{18, 19, 22, 23}

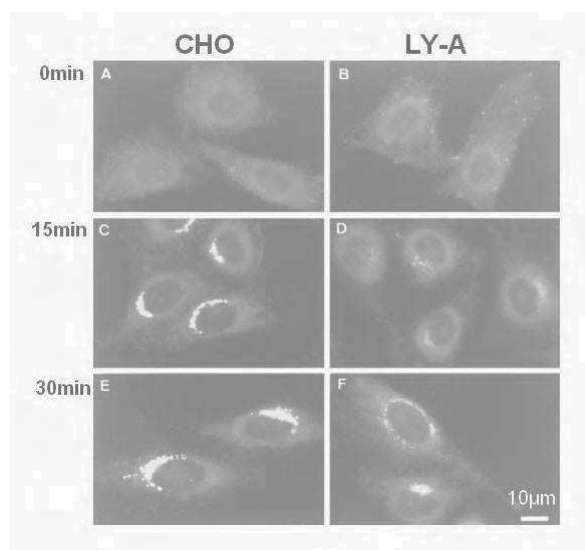


Figure 14 - Distribution du C5-DMB-Cer dans les cellules CHO (à gauche) et LY-A (à droite) au cours du temps, images issues de Hanada and coll. *J. Cell Biol.* 1999, 144, 673-685.¹⁸

Le transport du C5-DMB-Cer entre le réticulum endoplasmique (RE) (zone membranaire intracellulaire marquée à t=0min) et l'appareil de Golgi (zone périnucléaire) est 2 fois plus lent dans les cellules LY-A que dans les cellules CHO, du fait de la déficience des protéines de transport de céramide CERT dans cette lignée cellulaire (cf. Figure 14). L'ajout d'inhibiteur d'énergie dans les cellules CHO entraîne une diminution de la redistribution du C5-DMB-Cer : la fluorescence demeure plus marquée dans les membranes intracellulaires et l'accumulation de fluorescence est moindre dans l'appareil de Golgi (cf. images A et C de la Figure 15). L'inhibition d'ATP ne perturbe pas la distribution du C5-DMB-Cer dans les cellules LY-A (cf. images B et D de la Figure 15). Peu d'accumulation de fluorescence en zone périnucléaire est observée sur cette lignée puisque la protéine de transport de céramide CERT y est déficiente.

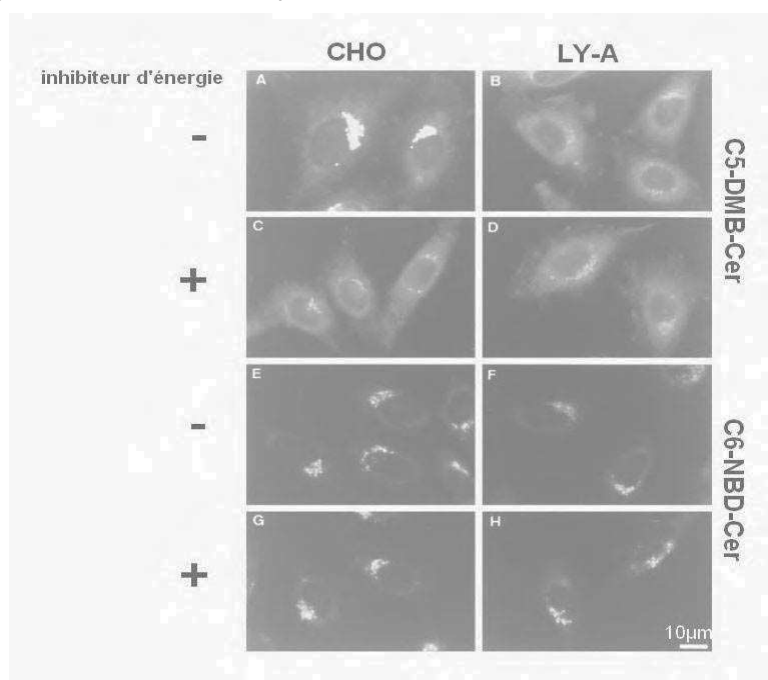


Figure 15 - Effet de l'inhibiteur d'énergie sur la redistribution du C5-DMB-Cer et C6-NBD-Cer dans les cellules CHO et LY-A après 15 min d'incubation, images issues de Hanada and coll. *J. Cell Biol.* 1999, 144, 673-685.¹⁸

En revanche, la distribution du C6-NBD-Cer ne semble pas être affectée par une déficience (cellule LY-A) ou une inhibition (ajout d'inhibiteur d'ATP) de la protéine CERT, puisque la fluorescence est accumulée dans la zone golgienne dans tous les cas (cf. images E, F, G et H de la Figure 15). L'étude du métabolisme de ces sondes a été réalisée par mesure de l'intensité de fluorescence des différents métabolites extraits des cellules et séparés par chromatographie préparative sur couche mince. Hanada a ainsi montré que le C5-DMB-Cer est très majoritairement converti en C5-DMB-SM, faisant ainsi intervenir la protéine CERT ; alors que le C6-NBD-Cer est à la fois converti en C6-NBD-SM et en C6-NBD-GlcCer. La conversion en C6-NBD-GlcCer fait intervenir une diffusion vésiculaire spontanée de cette sonde entre le RE et l'appareil de Golgi, expliquant l'accumulation de fluorescence observée au niveau de l'appareil de Golgi quel que soit la lignée cellulaire ou la présence ou non d'inhibiteur d'ATP. La comparaison des résultats obtenus avec ces deux sondes fluorescentes permet de démontrer que l'ajout d'inhibiteur d'énergie n'entraîne pas d'inhibition de la SMS ou de destruction de l'appareil de Golgi.

Ainsi l'étude de la redistribution du C5-DMB-Cer et/ou du C6-NBD-Cer et le dosage de leurs métabolites par intensité de fluorescence ont été réalisés sur des cellules CHO traitées ou non par l'HPA-12. Cette méthode a permis d'évaluer *ex vivo* le potentiel de l'HPA-12 à inhiber la protéine CERT²²⁻²⁴ (cf. Figure 16).

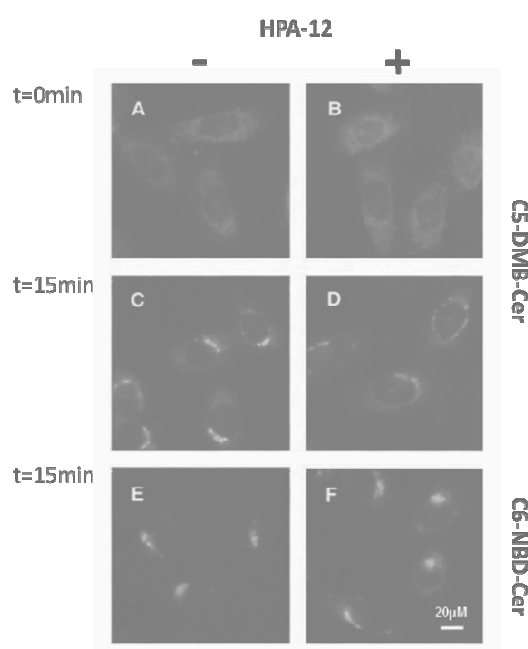


Figure 16 - Effet de l'HPA-12 sur la redistribution du C5-DMB-Cer (A-D) et C6-NBD-Cer (E-F) dans les cellules CHO après 15 min d'incubation, images issues de Yasuda et al. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 43994-44002.²³

Le deuxième type de marquage utilisé quelques années après pour évaluer de la conversion de céramide est un marquage radioactif. Deux précurseurs sont utilisés pour induire la biosynthèse d'un céramide radiomarqué : la [¹⁴C]sérine (voie de synthèse *de novo*) ou la [³H]sphingosine (voie de recyclage). De façon similaire aux sondes fluorescentes, les sondes radiomarquées sont incubées avec les cellules CHO et LY-A. Les lipides sont ensuite extraits, séparés par chromatographie préparative sur couche mince pour étudier les différents métabolites, puis dosés par intensité de radioactivité.¹⁸ La même tendance est observée sur le métabolisme des sondes radiomarquées que sur les sondes fluorescentes. Le céramide radioactif est produit dans les cellules CHO et LY-A puis il est converti en GlcCer et SM. Seule la conversion du Cer en SM est affectée dans les cellules LY-A, de

par leur déficience en CERT fonctionnelle. Le taux en SM y est 5 fois plus faible que dans les cellules CHO. La concentration des autres métabolites est identique dans les deux lignées cellulaires. Le suivi des métabolites radiomarqués dans les cellules CHO en présence de l'HPA-12 a permis d'évaluer *ex vivo* son potentiel d'inhibition de la protéine CERT^{22, 23} (cf. Figure 17).

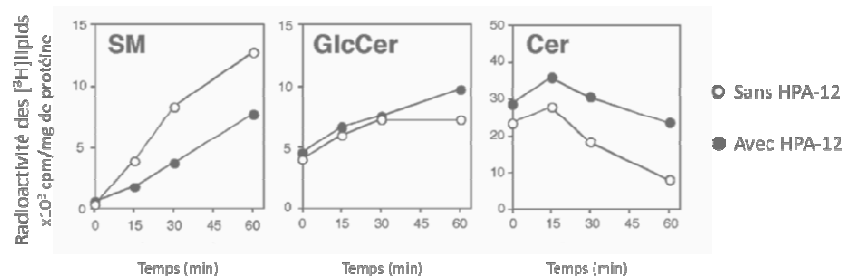


Figure 17 - Effet de l'HPA-12 sur la conversion de $[^3\text{H}]\text{Cer}$ en $[^3\text{H}]\text{SM}$ dans les cellules CHO préincubées avec $[^3\text{H}]\text{Sph}$, images issues de Yasuda et al. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 43994-44002.²³

De la même façon qu'avec l'HPA-12, l'application de ces deux méthodes sur des cellules CHO préalablement traitées par un compétiteur du céramide, permettraient d'évaluer *ex vivo* son potentiel d'inhibition de la protéine CERT.

b) Tests *in vitro*

Bien que moins représentatifs des phénomènes cellulaires, les essais *in vitro* sont des tests plus rapides et moins contraignants pour évaluer l'interaction d'un composé avec la protéine CERT. Au cours de ces quinze dernières années, plusieurs essais ont été décrits et optimisés pour évaluer l'activité de la protéine CERT.

Une des premières méthodes utilisées est le suivi du transport et de la conversion de sondes marquées radioactive ($[^3\text{H}]\text{sphingosine}$) ou fluorescente (C6-NBD-céramide) dans des cellules semi-intactes (dites cellules perforées).²⁵⁻²⁷

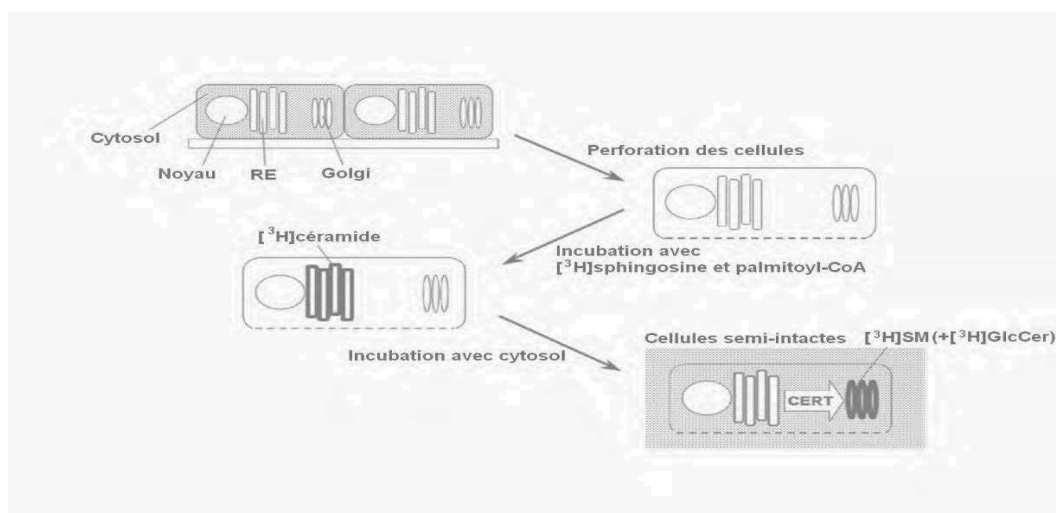


Figure 18 - Reconstitution d'un essai de transport de céramide dans des cellules semi-intactes, schéma adapté de Hanada and coll. *Methods in Cell Biol.* 2012, 108, 117-129.²⁷

Les cellules semi-intactes ont la membrane plasmique perforée, entraînant la perte du cytoplasme et des éléments qui y sont solubilisés.²⁸ L'incubation des cellules perforées avec la $[^3\text{H}]\text{sphingosine}$ et le palmitoyl-CoA permet la biosynthèse et l'accumulation du $[^3\text{H}]\text{céramide}$ dans le RE. L'incubation de

ces cellules pré-marquée avec du cytosol contenant de la protéine CERT (exogène ou non) et des facteurs de recyclage d'ATP permet d'évaluer le transport du céramide par la protéine et sa conversion par dosage des lipides, après extraction et séparation par chromatographie préparative sur couche mince. Cette technique permet de reproduire *in vitro* les conditions d'extraction et de transport du céramide entre le RE et l'appareil de Golgi et sa conversion en SM et GlcCer (cf. Figure 18).

D'autres méthodes ont été développées par la suite pour suivre l'extraction et/ou le transport du céramide par la protéine CERT dans des systèmes non cellulaires. L'une d'entre elles, développée par Hanada en 2003, consiste à quantifier le [^3H]céramide extrait par CERT à partir de membranes endoplasmiques isolées.¹⁹ Ces membranes sont pré-incubées avec de la [^3H]sphingosine et du palmitoyl-CoA pour produire le [^3H]céramide qui s'accumule dans les membranes endoplasmiques. Puis elles sont incubées en présence ou non de la protéine. Les lipides (céramide et sphingosine) du surnageant et de la membrane sont extraits, séparés et dosés. En présence de la protéine CERT, on retrouve du [^3H]céramide dans le surnageant ; alors qu'aucun lipide n'est observé dans le surnageant en absence de protéine. Cet essai a été utilisé pour évaluer l'inhibition de l'activité d'extraction de la protéine CERT en présence de l'HPA-12,¹⁹ puis du 3-chloro-8b-hydroxycarapin-3,8-hémiacétal, un composé limonoïde.²²

Dans le même article, Hanada propose une alternative à cet essai, en remplaçant la membrane endoplasmique par une vésicule phospholipidique. Le [^{14}C]céramide extrait de la vésicule phospholipidique en présence ou non la protéine CERT est alors quantifié de la même façon que précédemment.¹⁹

En 2005, Hanada optimise cette technique en évaluant l'activité d'extraction et de transport intermembranaire du [^{14}C]céramide de la protéine CERT, entre une vésicule phospholipidique donneuse mimant la membrane du RE et une vésicule phospholipidique acceptrice mimant l'appareil de Golgi^{19, 26, 29} (cf. Figure 19).

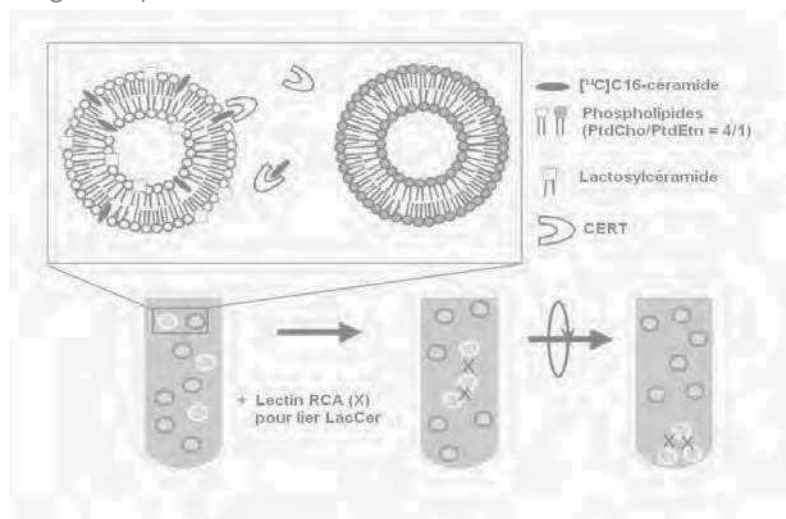


Figure 19 - Transfert intermembranaire du céramide entre vésicules phospholipidiques donneuse et acceptrice mesuré par radioactivité, schéma adapté de Hanada, *Mol. Cell. Biochem.* 2006, 286, 23-31.²⁶

En présence de la protéine, le céramide est extrait des vésicules phospholipidiques donneuses et est accumulé dans les vésicules acceptrices. La séparation des vésicules donneuses (contenant du lactosylcéramide, LacCer) et des vésicules acceptrices est possible grâce à l'ajout de lectine RCA qui

complexe le LacCer. Le complexe lectine-LacCer forme des agrégats qui s'accumulent dans le culot après centrifugation. La quantité de céramide transféré est alors déterminée après centrifugation par la différence de radioactivité entre le surnageant (vésicules acceptrices) et la fraction résiduelle (vésicules donneuses). Cet essai a permis d'évaluer l'inhibition de la protéine CERT par des HPAs en pré-incubant les vésicules donneuses en présence de la protéine CERT et un HPA.²⁹

Dans ce même article, une autre méthode *in vitro* est présentée pour évaluer l'interaction avec la protéine par un test de liaison spécifique avec les sondes fluorescentes C5-DMB-Cer ou C6-NBD-Cer²⁹ (cf. Figure 20).

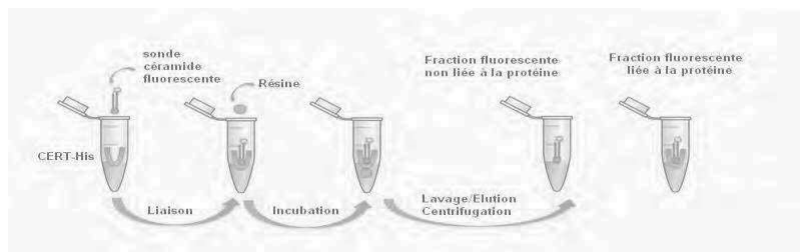


Figure 20 - Test de liaison spécifique avec la protéine CERT par intensité de fluorescence (FLINT)

La protéine CERT recombinante étiquetée avec l'histidine est incubée en présence d'un céramide fluorescent (C5-DMB-Cer ou C6-NBD-Cer), puis le complexe résultant est fixé à une résine d'affinité au cobalt. Différentes étapes de lavages et d'élution avec des solutions d'imidazole permettent de récolter des fractions dans lesquelles la fluorescence est dite « non liée à la protéine » (due à l'émission de la sonde sous forme libre) et une fraction fluorescente dite « liée à la protéine » (résultant de l'émission du complexe). La lecture du test est basée sur le calcul du rapport des intensités de fluorescence de la fraction « liée à la protéine » et de l'ensemble des fractions « non liées à la protéine » réunies. Cet essai a ainsi permis d'évaluer directement la liaison spécifique du céramide fluorescent avec la protéine avec un rapport stœchiométrique de 1 :1.

En 2010, Takahashi et Shimada évaluent l'activité d'extraction du céramide non marqué d'une vésicule lipidique par la protéine CERT en temps réel, par mesure du signal de résonance plasmonique de surface (SPR).³⁰ Le liposome contenant le céramide est immobilisé sur une puce de détection. Lorsque le domaine START de CERT est injecté, il vient interagir avec le liposome, modifiant alors l'indice de réfraction de la surface et perturbant ainsi le signal SPR. Lorsque le liposome est dépourvu de céramide, le signal est faiblement perturbé au cours de l'injection de START, puis revient au niveau initial. Lorsqu'il y a extraction du céramide du liposome par START, il y a une baisse du signal SPR proportionnel à l'activité d'extraction.

En 2011, Mattjus a développé une alternative à l'essai de transport intervésiculaire, basé sur la fluorescence par transfert d'énergie de résonance (FRET)³¹ (cf. Figure 21).

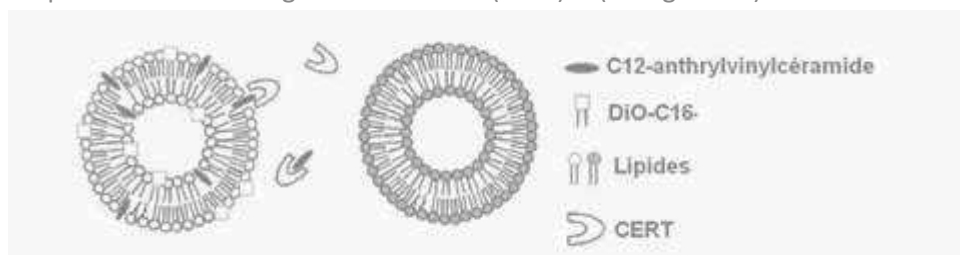


Figure 21- Transfert intermembranaire du céramide entre vésicules lipidiques donneuse et acceptrice mesuré par signal FRET³¹

Dans cet essai, la sonde fluorescente C12-anthrylvinylcéramide, transférable par CERT, est le donneur de signal FRET et le DiO-C16, non mobile, représente le partenaire accepteur. Les vésicules lipidiques donneuses de céramide contiennent les deux partenaires de FRET et les vésicules acceptrices sont dépourvues de DiO-C16. Dans les vésicules donneuses, la proximité des deux partenaires de FRET permet un transfert du signal qui résulte en une émission de fluorescence de faible intensité, l'accepteur DiO-C16 étant faiblement fluorescent en milieu aqueux. De ce fait, le DiO-C16 joue un rôle d'extinction de fluorescence de la sonde C12-anthrylvinylcéramide. Lorsque la protéine CERT transfère le C12-anthrylvinylcéramide des vésicules donneuses vers les vésicules acceptrices, l'extinction de fluorescence du C12-anthrylvinylcéramide est levée. Le transport du céramide se traduit alors par une augmentation de l'intensité de fluorescence. L'avantage de cette technique est le suivi en temps-réel du transfert de céramide, sans étape de séparation des vésicules donneuses et acceptrices.

Bien qu'en offrant la possibilité, aucun de ces tests *in vitro*, à l'exception des essais d'extraction des membranes endoplasmiques et de transports intermembranaires, n'a été utilisé pour évaluer le pouvoir d'un compétiteur sur la protéine CERT. Ainsi, la réalisation de ces essais avec la pré-incubation d'un composé compétiteur avec la protéine CERT permettrait d'évaluer son potentiel inhibiteur.

2) Test de liaison spécifique optimisé

Le test de liaison spécifique à la protéine CERT par intensité de fluorescence développé par Hanada²⁹ semble adapté, de par sa modularité et sa simplicité de mise en œuvre, pour évaluer *in vitro* la reconnaissance d'un ligand par la protéine CERT, au travers de sa capacité à entrer en compétition avec la sonde fluorescente. Cependant, ce test a été validé avec des céramides fluorescents commerciaux dans lesquels le fluorophore est porté par une courte chaîne acyle, limitant a priori la reconnaissance avec la protéine. En effet, la longueur de la chaîne amide des céramides conditionne leur interaction avec la protéine.²⁹ Hanada a ainsi montré que les céramides C14, C16, C18 et C20 étaient les mieux transférés dans son essai *in vitro* de transport intermembranaire.

Ainsi, l'optimisation du test de liaison spécifique à la protéine CERT, initialement développé par Hanada, a été initiée avant mon arrivée au laboratoire. Cette optimisation a porté sur :

- le développement de sondes fluorescentes céramide-NBD présentant un profil physico-chimique le plus ressemblant possible à celui du céramide naturel. Notamment, le fluorophore a été introduit à l'extrémité du squelette sphingoïde, permettant ainsi des longueurs de chaînes amides variables (C2, C6 et C16) pour étudier l'influence de la lipophilie de la sonde sur sa reconnaissance par la protéine. La sonde C16-céramide-NBD s'est avérée être mieux reconnue par CERT que les sondes C2 et C6 synthétisées et que le C6-NBD-céramide commercial.
- l'évaluation de la pertinence biologique de la sonde C16-céramide-NBD par l'étude de son métabolisme dans les cellules CHO, LY-A et les cellules LY-A transfectées avec de la protéine CERT recombinante, LY-A/hCERT. La sonde a montré un comportement comparable à celui du céramide naturel.
- la validation du test de liaison spécifique entre CERT et la nouvelle sonde C16-céramide-NBD,
- la validation du test de liaison spécifique entre le domaine START de CERT et cette même sonde,
- le développement du test de liaison entre le domaine START et le C16-céramide-NBD en compétition avec des antagonistes potentiels de la protéine. De fait, lorsqu'il y a compétition, la sonde C16-céramide-NBD est moins liée à la protéine, l'intensité de fluorescence de la « fraction liée » diminue au profit de celle de la « fraction non liée ». Plus l'intensité de fluorescence de la « fraction liée » à la protéine sera faible, meilleure sera l'interaction du compétiteur avec la protéine.

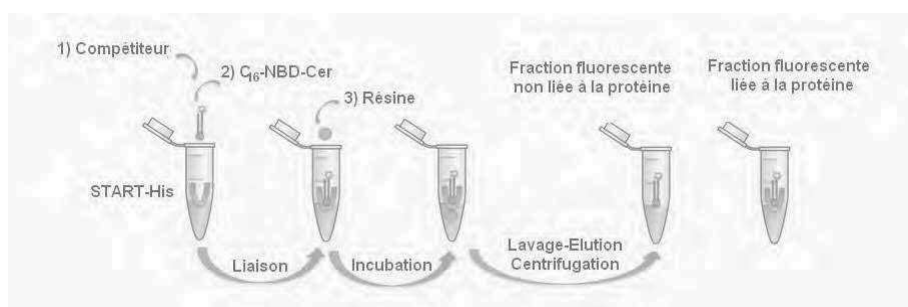


Figure 22 - Test de liaison spécifique avec le domaine START de la sonde C16-NBD-céramide en présence de compétiteur

L'ensemble de ces travaux est décrit dans l'article suivant.³²

Cite this: *RSC Advances*, 2013, 3, 18970

A biologically relevant ceramide fluorescent probe to assess the binding of potential ligands to the CERT transfer protein†

Stéphanie Combemale,^a Cécile Santos,^a Frédéric Rodriguez,^a Virginie Garcia,^c Chantal Galaup,^a Céline Frongia,^b Valérie Lobjois,^b Thierry Levade,^c Cécile Baudoin-Dehoux,^a Stéphanie Ballereau^{*a} and Yves Génisson^{*a}

The conversion of ceramide into sphingomyelin (SM) was only recently considered in relation to cancer. Overexpression of the CERT protein, responsible for a highly specific inter-organelle ceramide transfer step along the *de novo* SM synthesis pathway, has been associated with multi-drug resistance of cancer cells. Identification of new CERT antagonists may therefore lead to potential resensitizing agents. This work describes the first attempt to design a ceramide-based fluorescent probe optimised to evaluate the binding of potential CERT ligands. A prototypical structure with an ω -labelled sphingosine backbone was selected. Its possible recognition mode by CERT was first evaluated by means of a precursory molecular modelling study. Three derivatives with various amide chain lengths were prepared and tested. The binding efficiency was shown to be proportional to the lipophilicity of the acyl moiety. The best compound bearing a C16 amide fragment was used to implement a practical binding experiment. Facile assessment of the recognition by the CERT START domain of various structures was thus ensured. Metabolism and imaging experiments were also used to illustrate the capacity of the proposed fluorescent ceramide analogue to mimic the natural ceramide cellular behaviour. This work led to the synthesis and evaluation as an efficient CERT START domain ligand of a ω -biotinylated ceramide, a potential probe to develop the screening of new CERT antagonists.

Received 15th May 2013,
Accepted 24th July 2013

DOI: 10.1039/c3ra42395f

www.rsc.org/advances

Introduction

Sphingolipids, a widespread family of lipids built on the sphingosine backbone, are now recognized as major players in cell signalling.¹ They are notably involved in the regulation of cell proliferation and/or apoptosis.² As ubiquitous membrane components, sphingolipids can regulate the phospholipid bilayer fluidity and permeability in response to stress stimuli.³ They also exert their effects as second messengers through the binding to several intra- and extra-cellular target proteins and receptors.⁴ Of particular note is the fact that, by means of a single (bio)chemical modification, the signalling effect of sphingolipids can switch from proliferative to anti-proliferative (Fig. 1). The notion of “sphingolipid rheostat” was

proposed to describe the balance between the pro-apoptotic ceramide and sphingosine molecules and the proliferative and angiogenic sphingosine-1-phosphate.⁵ Therefore, elicitation (or repression) of a sphingolipid-mediated cell response implies a rapid and/or sustained adjustment of their relative intracellular rates through the control of the appropriate metabolic machinery.⁶

Dysregulated sphingolipid metabolism is widely associated to cell tumorigenicity, cancer cell proliferation, metastasis and chemo-resistance.⁷ According to a general scheme, cancer cells are characterised by a deregulated sphingolipid balance, in favour of tumour-promoting sphingolipids (sphingosine-1-

^aSPCMIB, UMR5068 CNRS-Université Paul Sabatier-Toulouse III, 118 route de Narbonne, Toulouse, F-31062, France. E-mail: genisson@chimie.ups-tlse.fr; ballereau@chimie.ups-tlse.fr; Fax: +33 (0)561556011; Tel: +33 (0)561556299

^bITAV, USR3505 CNRS-Université Paul Sabatier-Toulouse III, F-31106 Toulouse, France

^cCRCT, UMR1037 INSERM-Université Paul Sabatier-Toulouse III, CHU Rangueil, Toulouse, BP 84225, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: ¹³C NMR spectra of all new compounds, molecular modelling data, and cellular imaging data. See DOI: 10.1039/c3ra42395f

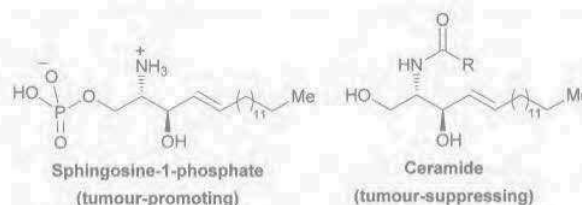


Fig. 1 Structures of representative bioactive sphingolipids.

phosphate) over their tumour-suppressing counterparts (sphingosine and ceramide).⁸ Several enzymatic pathways have emerged as potential anti-cancer target to restore the intracellular rate in ceramide and repress the production of sphingosine-1-phosphate.⁹ Sphingosine kinase has been for example widely studied in this context.¹⁰ Enzymes that directly convert the ceramide, *i.e.* ceramidase¹¹ or glucosylceramide synthase¹² also gave rise to numerous studies.

The conversion of ceramide into sphingomyelin (SM) represents a metabolic pathway that was only recently addressed in relation to cancer.¹³ This transformation lies upstream from the classical “sphingolipid rheostat”. SM, by far the most abundant sphingolipid, has not been associated to any signalling effect. However, it is viewed as a “feedstock” metabolite for rapid release of ceramide at the plasma membrane, upon action of sphingomyelinases in response to stress stimuli.¹⁴ The introduction of a phosphocholine group onto the primary hydroxyl group of ceramide to yield SM is catalysed by sphingomyelin synthase.¹⁵ We recently reported the pro-apoptotic natural anhydrophytosphingosine jaspine B and several synthetic analogues thereof as the first selective inhibitors of sphingomyelin synthase, triggering apoptosis likely *via* elevation of intracellular levels of ceramide.¹⁶ However, due to the tight subcellular compartmentalisation of sphingolipids, the ceramide-to-SM pathway also depends on a specific inter-organelle transfer step (Scheme 1).¹⁷

The CERT (for CERamide Transfer) protein is responsible for the highly selective trafficking of ceramide from the Endoplasmic Reticulum (ER), where takes place its *de novo* synthesis, to the site of SM production in the *trans*-Golgi apparatus.¹⁸ The relevancy of this ceramide non-vesicular transport machinery in the context of cancer was recently evidenced.¹⁹ It was shown that overexpression of CERT was associated to multidrug resistance in various cancer cell lines. Moreover, genetic or pharmacological inhibition of CERT could restore the sensitivity of multiresistant cells to paclitaxel. These results suggested that inhibition of CERT-mediated ceramide transport might be a relevant strategy to resensitize cancer cells to chemotherapeutic agents.²⁰ Yet,

chemical series known to interfere with CERT-mediated ceramide trafficking are scarce. Recently Kobayashi and coll. identified limonoid compounds as inhibitors of the SM synthesis preventing CERT-dependent ceramide extraction from ER.²¹ On the other hand, only a single family of proper CERT antagonists, namely HPAs, was described to date (*vide infra*).²² Yet, it is likely that new active molecular archetypes will be highly desirable in the future to fully assess the anti-cancer therapeutic potential of CERT inhibition.

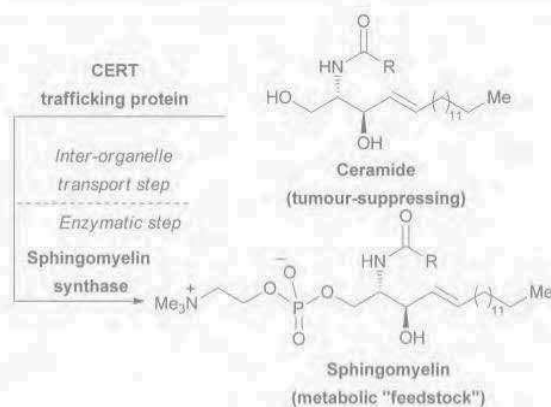
There is a constant need for the development of labelled sphingolipid analogues affording relevant insights into cell signalling-associated metabolic deregulations.²³ Numerous examples of user-friendly fluorescent analogues have been described and eventually employed as biochemical or cellular probes.²⁴ Ceramide derivatives typically arise from the straightforward introduction of the fluorescent probe by acylation of natural sphingosine with a labelled fatty acid residue. C6-NBD-Cer and C5-DMB-Cer, embedding a truncated aliphatic amide portion, represent the most widely used probes. The length of the lipophilic amide chain is however known to determine many of the physicochemical and biological properties of ceramide. Conditioning its water solubility and interaction with membranes it notably influences ceramide cell uptake, translocation and subsequent intracellular localisation. The overall lipophilicity of ceramide derivatives also likely influences its interaction with proteins or other intracellular targets.⁴

Regarding the CERT protein, studies involving fluorescent ceramides were so far somewhat limited regarding the nature of the probe. At one exception involving an anthrylvinyl-labelled derivative,²⁵ they are restricted to the use of standard *N*-[6-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]-*D*-erythro-sphingosine (C6-NBD-Cer) and *N*-[5-(5,7-dimethyl BODIPY)-1-pentanoyl]-*D*-erythro-sphingosine (C5-DMB-Cer).^{18a,b,26} The limited relevancy in intact cells or cell-free transfer experiments of short chain fluorescent probes such as C6-NBD-Cer²⁷ or C5-DMB-Cer²⁸ was however noticed, due to their significant spontaneous intermembrane transfer rate. We thus felt that the study of CERT deserved the development of an accessible and better-optimised ceramide-based fluorescent probe, facilitating for instance the assessment of the protein interaction with diverse potential antagonists. We report here our first results along this line.

Results and discussion

Design and preparation of the fluorescent probe

As mentioned above, for obvious synthetic motives, the preparation of fluorescent ceramide analogues has often been restricted to derivatives embedding a tagged amide chain. The recent development of efficient and flexible olefin cross metathesis procedures afforded a convergent access to ω -labelled sphingosine backbone.²⁹ Recent studies by Ettmayer and Nussbaumer described the use of this approach to prepare fluorescent ceramide derivatives, among other



Scheme 1

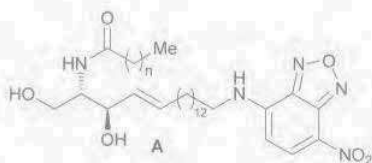


Fig. 2 Proposed ceramide-based generic probe A.

sphingolipid analogues.³⁰ The localisation of the fluorescent tag on the sphingosine backbone should present several advantages, such as the fine adjustment of the lipophilicity through the adequate choice of the aliphatic amide moiety. The possibility of tracking the probe downstream its *in cellulo* hydrolysis into sphingosine would be another benefit.³¹ However, to the best of our knowledge, biological applications of such ceramide probes remain surprisingly scarce.³²

On the basis of these observations, we thus targeted the generic structure A (Fig. 2), embedding a readily accessible 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD) chromophore, as potentially optimised fluorescent ceramides to probe the binding to CERT.

Computational study

Prior to the synthesis of these compounds we explored the possibility to evaluate their interaction with CERT on computational grounds. It is worth of note that, despite recent reports of crystallographic data regarding CERT START domain,³³ no molecular modelling studies were published to date.

CERT is a 68 kD hydrophilic cytoplasmic protein composed of two main terminal domains.^{18c} A pleckstrin homology (PH) domain of *ca.* 120 amino acids is located in the amino terminal region whereas the *ca.* 230 amino acids of the carboxyl terminal region form a steroidogenic acute regulatory protein-related (START) domain. The central *ca.* 250 amino acids sequence contains two identified peptide motifs, FFAT and serine-repeat (SR). Whereas the SR motif is involved in the phosphorylation-controlled regulation of CERT activity,³⁴ other domain and motifs play a define role in the ER-to-Golgi apparatus ceramide trafficking function.³⁵ The PH domain ensures the association of CERT with the Golgi apparatus through its binding to the phosphatidylinositol-4-monophosphate (PI4P) presented by this organelle. On the other hand, the FFAT motif is involved in the interaction with the hydrophilic region of VAP proteins oriented toward the cytosolic side of the RE membrane. Finally, the START domain is directly responsible for ceramide membrane extraction and binding. X-ray crystal structures of the START domain in complex with different ceramides or HPA inhibitors are available, giving key insights into the protein-ligand interactions at a molecular level.³³

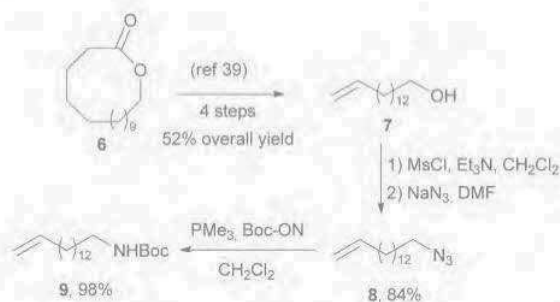
These co-crystallizations show that the CERT START domain has a large amphiphilic cavity in the center of the protein where ligand can encase. Comparisons between the different liganded structures suggest that mean positions of aliphatic chains are conserved in binding site forming 'lipidic pathways' as shown in Fig. 3A. The positioning of lipid chains in the

cavity thus clearly appears not to follow random paths. Moreover the typical interaction patterns for the polar part of ceramides (amide and hydroxyl groups) include one σ - π interaction with PHE579 and hydrogen bonds with TYR553, GLU446, GLN467 and ASN504 (optionally with PHE436, ARG442, TYR482).³³ Furthermore the structures liganded by ceramides show an opened portal. This portal allows the end of one of the two aliphatic chains of the ceramide to get out of the cavity (P, Fig. 3A). It is surrounded by alpha-3 helix and omega-1 loop, which are supposed to act as a gate for entry of ceramide inside the cavity.^{33a} In the C6-ceramide bound structure, both aliphatic chains are enclosed completely in the hydrophobic part of the cavity. On the other hand in the natural C16- and C18-ceramide bound structures, the sphingosine backbone is directed toward the outside of the protein through the portal. On the basis of these structural observations, we envisioned that probes A bearing a sufficiently long acyl chain would mimic a natural ceramide and that the NBD chromophore at the extremity of the sphingosine of backbone would point outside of the protein.

To model the binding mode of this compound we perform a docking study based on the co-crystal structure of C6-ceramide bound to the START domain (pdb code: 2E3N) using the Molegro Virtual Docker 5.5 software. This structure was found to be representative of ceramide conformations and binding cavity, after structural alignments. We used these structural data to define three docking templates³⁶ on the C16-ceramide: H donors (O and N atoms of hydroxyl and amide groups), H acceptors (O atoms of hydroxyl and amide groups), steric (all atoms) were defined. The calculations include also flexibility of amino acids (45 residues) around the binding site and a final energy minimization step for lateral chain of residues and protein backbone. The molecular docking of very flexible ligands (*i.e.* above 20 torsion items in a molecule) is a challenging task, and results must be considered as proof of concept rather than predictive results. However the conformation of C16-ceramide was reproduced with near 1 Angstrom of RMSD between the crystallographic conformation (pdb code: 2E3O) and the best scoring docking pose (see ESI†).³⁷ The probe A was thus submitted to molecular docking using the previously established parameters set. At this stage, structure A with $n = 14$ was selected to allow a direct comparison with C16-ceramide. We found 11 poses equally distributed in the group of the 50 best poses (rerank score calculated by Molegro) that correspond to putative conformations of probe A ($n = 14$) in which the fluorescent group is found outside the protein and crossing the portal (see ESI†). Detailed analysis of these conformations reduced this set to four poses (Fig. 3B, wireframe) showing a good match of hydroxyl, amido and alkene groups position with crystallographic conformation of C16-ceramide (Fig. 3B, sticks). In these cases, the hydroxyl and amido groups of probe A ($n = 14$) reproduced the hydrogen bonds network of liganded ceramide crystallographic structure.^{33a} The carbonyl group of the amido function is engaged in a H-bond with the hydroxyl of TYR553 and the NH₂ of GLN467 bonds to the oxygen primary hydroxyl group. On the other hand, the NH of the amide of the probe A interacts through an H-bond with the carboxylate of GLU446. Hydroxyl groups of primary and secondary alcohol are involved in an

Paper

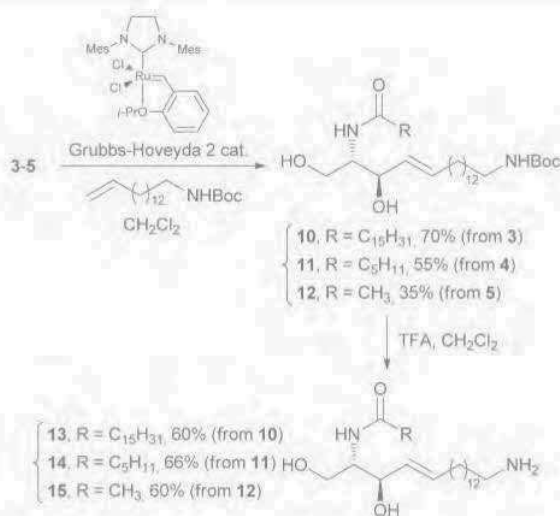
RSC Advances



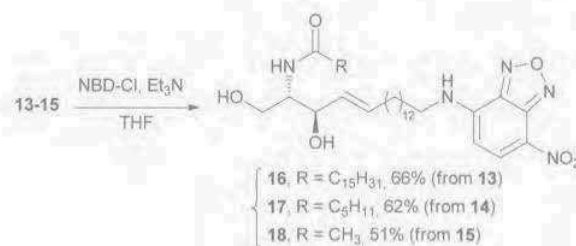
Scheme 3

The required second olefin partner **9** was prepared as described in Scheme 3. The route started from the macrocyclic lactone **6** embedding the C15 skeleton required for the final assembly of the sphingosine backbone. The latter was first converted into the primary alcohol **7** through a straightforward synthetic route.³⁹ Introduction of the Boc-protected primary amine was then accomplished from **7** in a three-step sequence including the direct conversion of the azide **8** into NHBoc group by means of the Vilarrasa's procedure.⁴⁰

Olefin cross-metathesis between precursors **3–5** and a 4-fold excess of **9** proceeded smoothly using the Grubbs-Hoveyda-II catalyst in refluxing CH_2Cl_2 (Scheme 4). The expected NHBoc intermediates **10–12** were obtained in 35–70% isolated yield (based on olefins **3–5**) as a single *E* isomer. Cleavage of the Boc protecting group required on the other hand some optimisation. Indeed, during preliminary attempts, we found that direct concentration to dryness of the reaction mixture induced an extensive acid-catalysed *N* to *O* migration of the acyl group, leading to an inseparable mixture of aliphatic amide and ester. Gratifyingly, neutralisation of the reaction mixture prior to work up allowed complete suppression of this



Scheme 4



Scheme 5

isomerisation process. The free pivotal amines **13–15** were thus isolated in a 60–66% purified yield.

The key intermediates **13–15** underwent facile and efficient *N*-functionalization. Smooth introduction of the NBD moiety was accomplished by treatment with the corresponding chloride in the presence of Et_3N , delivering the targeted fluorescent probes **16–18** in 51–66% purified yield (Scheme 5).

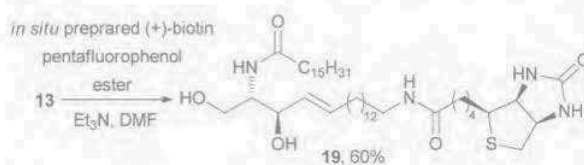
In order to illustrate the flexibility of our approach, we also targeted a biotinylated ceramide derivative. Smooth coupling of primary amine **13** with an activated biotin derivative led to the ceramide probe **19** in good yield (Scheme 6). Such a compound represents a potential tool to further develop fluorescent-based CERT binding assays with labelled streptavidine derivatives.

With the fluorescent ceramide analogues **16–18** in hand, we further explored their use as probes to assess the binding to CERT.

Binding experiments with CERT

In vitro CERT-mediated ceramide intermembrane transfer assay systems almost exclusively rely on the use of radioactive probes.⁴¹ Quantification of the CERT-induced ceramide extraction, or transport, from phospholipid vesicles was for example based on the use of a [^{14}C]-ceramide derivative.^{18a} Interestingly, fluorescent ceramide derivatives have been developed to monitor the cell-free intervesicular transfer of glycosphingolipids.⁴² In the case of CERT however, the spontaneous intermembrane transfer rate of commercially available short chain ceramide analogues was shown to hamper their use in such cell-free studies.^{27b}

In 2005, Hanada and coll. reported a straightforward binding assay evidencing that CERT recognised C6-NBD-Cer and C5-DMB-Cer.^{18b} We considered that this experiment was ideally suited to evaluate the specific binding of the fluorescent ceramide **16–18** to CERT in a practical manner. According to this procedure, the His-tagged recombinant



Scheme 6

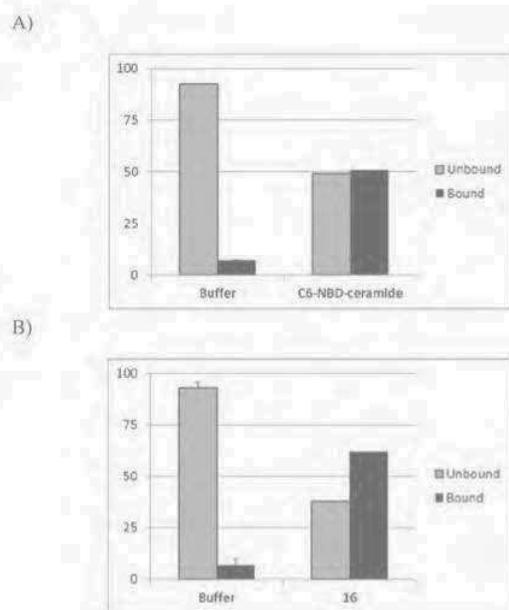


Fig. 4 Binding assays of C6-NBD-Cer (A) and probe **16** (B) to CERT recombinant protein. Recombinant CERT (2 eq.) and C6-NBD-Cer (1 eq.) or probe **16** (1 eq.) were incubated at 37 °C for 30 min. As a negative control, TBS buffer was added in place of the protein. Protein liganded by the fluorescent probe was captured with a Talon® metal affinity resin. Washes furnished several fractions ("free fraction", "wash fraction 1", "wash fraction 2" see Experimental part). The fluorescent probe-protein complexes were eluted by incubation of the resin with TBS containing 250 mM imidazole to furnish the "bound fraction". Residual non-specifically bound fluorescence was extracted by an organic solvent. The fluorescence present in each fraction was measured. The black bars represent the fluorescence in the "bound fraction" expressed as a percentage of the total fluorescence and the hatched bars represent the fluorescence in all other fractions ("free fraction", "wash fraction 1", "wash fraction 2" and "residual fraction") as a percentage of the total fluorescence. Results are means \pm S.D. from triplicate experiments.

protein was first incubated with the fluorescent probe. The resulting complex was fixed on a metal affinity resin allowing washing of the unbound probe prior to elution of the fluorescent ceramide-CERT complex. Ratio between the fluorescence intensity of this bound fraction and that of the gathered washing fractions allowed quantification of the probe binding to CERT.

In order to get a direct comparison with the previous study by Hanada and colleagues,^{18b} we first assessed the binding of the probe **16** to the entire CERT protein. The fluorescence of the bound fraction, quantifying the fluorescent ceramide-CERT complex formed, was expressed as a percentage of the total fluorescence recovered. As can be seen from Fig. 4, the assay with the probe of reference C6-NBD-Cer led to 51% of the fluorescence in the bound fraction (Fig. 4A). Gratifyingly, when the fluorescent ceramide **16** was used instead, a stronger value of 62% was recorded, suggesting a higher affinity of this probe for CERT (Fig. 4B).

Having demonstrated the recognition of **16** by the whole protein, we focused on the START domain, known to be exclusively responsible for the ceramide binding. The use of

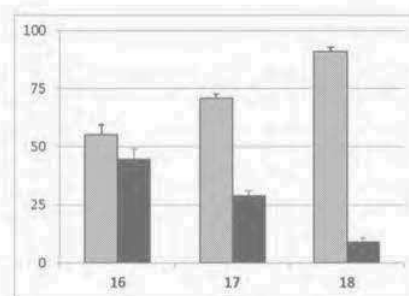


Fig. 5 Binding assays of compounds **16**, **17** and **18** to START domain. Recombinant START domain (2 eq.) and compound **16**, **17** or **18** (1 eq.) were incubated at 37 °C for 30 min. As a negative control, TBS buffer was added in place of the protein. Then the washing and elution protocol described in Fig. 4 legend was applied. The black bars represent the fluorescence in the "bound fraction" expressed as a percentage of the total fluorescence and the hatched bars represent the fluorescence in all other fractions ("free fraction", "wash fraction 1", "wash fraction 2" and "residual fraction") as a percentage of the total fluorescence. Results are means \pm S.D. from triplicate experiments.

the START domain in place of the entire CERT protein appeared indeed highly advantageous for practical and economical reasons. The previous binding experiment was thus adapted to the START domain of CERT. The fluorescent ceramide **16** still compared favourably to the C6-NBD-Cer (see ESI†). To get a more complete picture, we also run binding experiments with the C5-DMB-Cer, considered as a relevant probe to follow CERT-dependant intracellular ceramide redistribution.^{26a} The latter led to an inferior value of fluorescence in the bound fraction compared to the C6-NBD-Cer (see ESI†).

The binding of the fluorescent C16-ceramide **16** being evidenced, we wished to assess the influence of the fatty amide hydrophobicity by comparing it with that of the related compounds **17** and **18** bearing a C6 and C2 aliphatic amide portion respectively. The hydrophobic amide portion was indeed anticipated strongly contribute to the interaction. Binding experiments showed that the recognition for CERT of the ceramide probes was indeed proportional to the lipophilicity of amide moiety and could thus be tuned by adjusting the aliphatic chain length (Fig. 5).

To further demonstrate the relevance of the binding of the probe **16** to the START domain of CERT, we assessed its specificity by performing competition experiments. The protein was first pre-incubated with a natural CERT ligand, C18-ceramide. Then an equimolar amount of the probe was added and after a period of incubation, the binding assay was run as before. This experiment led to a striking reduction of the fluorescence intensity in the bound fraction, clearly indicating that the C18-ceramide competed with the probe **16** for the binding to the START domain. We further evidenced that this effect was dose-dependent by varying the amount of natural ceramide from 0.01 to 1000 equivalents. A clear dose-response relationship was observed as shown in Fig. 6.

Finally, competition experiments were generalised to a wide array of potential CERT ligands. We first selected a pool of molecules known for not being transferred by CERT in a cell-free intervesicular transfer assay, *i.e.* cholesterol, glucosylcer-

Paper

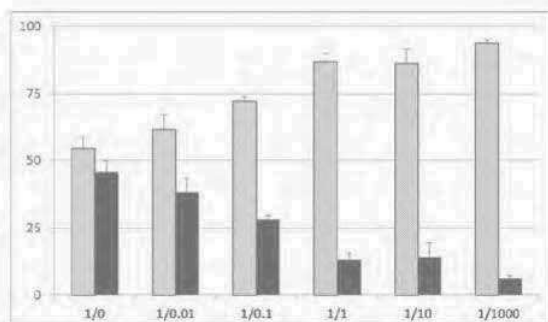


Fig. 6 Binding assays of compounds **16** to START domain in the presence of an increasing concentration of Cer. Recombinant START domain (1 eq.) and Cer (0 to 1000 eq.) were incubated at 37 °C for 30 min. Then compound **16** (1 eq.) was added and the mixture was incubated at 37 °C for 30 min. Then the washing and elution protocol described in Fig. 4 legend was applied. The black bars represent the fluorescence in the "bound fraction" expressed as a percentage of the total fluorescence and the hatched bars represent the fluorescence in all other fractions ("free fraction", "wash fraction 1", "wash fraction 2" and "residual fraction") as a percentage of the total fluorescence. Results are means \pm S.D. from triplicate experiments.

amide (GlcCer), SM, C24-ceramide and dioleoylglycerol (DAG).^{18a,b} Pre-incubation with an equimolar amount of GlcCer, cholesterol and SM (in relation to the probe **16**) led to an almost unaffected amount of fluorescence in the bound fraction (Fig. 7). This can be easily attributed to the structural dissimilarity of these lipids with the natural CERT ligands. The results with DAG and C24-ceramide were less contrasted, showing that these sphingolipids were somewhat recognised by CERT (Fig. 7). The apparent discrepancy between this observation and the absence of significant CERT-mediated intermembrane transfer reported earlier suggests that the protein binding may only partially contribute to the overall

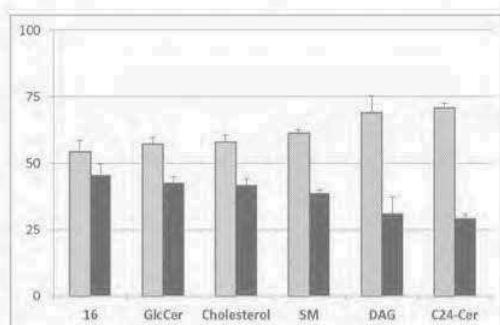


Fig. 7 Binding assays of compounds **16** to START domain in the presence of competitors. Recombinant START domain (1 eq.) and competitor (1 eq.) were incubated at 37 °C for 30 min. Then compound **16** (1 eq.) was added and the mixture was incubated at 37 °C for 30 min. Then the washing and elution protocol described in Fig. 4 legend was applied. The black bars represent the fluorescence in the "bound fraction" expressed as a percentage of the total fluorescence and the hatched bars represent the fluorescence in all other fractions ("free fraction", "wash fraction 1", "wash fraction 2" and "residual fraction") as a percentage of the total fluorescence. Results are means \pm S.D. from triplicate experiments.

RSC Advances

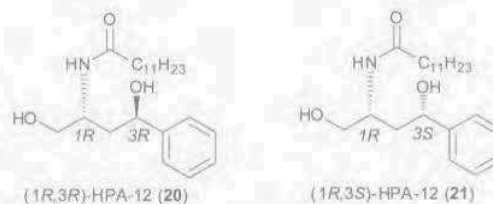


Fig. 8 Structures of the HPA-12 stereoisomers evaluated.

transfer process of these lipids. Notably, a crystal structure of a C10-DAG and C24-ceramide in complex with the START domain has been reported, unambiguously evidencing a molecular recognition.^{33a}

We then evaluated known CERT ligands, *i.e.* HPAs, members of the only CERT antagonist family described to date. Only a single stereoisomer out of the four of the HPA-12 (bearing a dodecanoylamide residue) was reported to be active.^{22b} However, the configuration of the C-3 of HPA-12 has been recently discussed and we decided to test both (1R,3R) and (1R,3S) diastereoisomers **20** and **21** respectively (Fig. 8).⁴³

Interestingly, both C-3 epimers were shown to strongly compete with the fluorescent probe **16** for the binding to CERT. This result confirmed the pronounced affinity of HPA-12 for the transfer protein, in the same order of magnitude as that of the C18-ceramide natural ligand (Fig. 9). However, it leaves open the debate regarding the configuration at C-3 since both diastereoisomers **20** and **21** gave comparable results. It might be interesting to note that we found no report in the literature on the evaluation of the (1R,3S)-HPA-12 itself as an inhibitor of the CERT-mediated ceramide transfer, but only of the racemic mixture (1R,3S)/(1S,3R).^{22b}

Finally, having confirmed the binding of known CERT ligands, we used the same protocol to test the new biotinylated

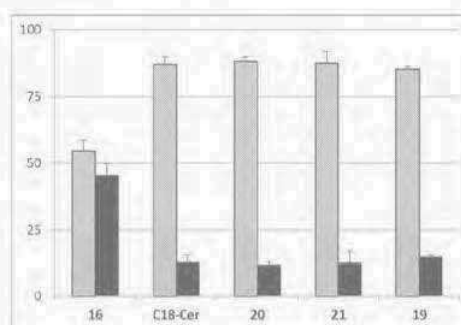


Fig. 9 Binding assays of compounds **16** to START domain in the presence of competitors. Recombinant START domain (1 eq.) and competitor (1 eq.) were incubated at 37 °C for 30 min. Then compound **16** (1 eq.) was added and the mixture was incubated at 37 °C for 30 min. Then the washing and elution protocol described in Fig. 4 legend was applied. The black bars represent the fluorescence in the "bound fraction" expressed as a percentage of the total fluorescence and the hatched bars represent the fluorescence in all other fractions ("free fraction", "wash fraction 1", "wash fraction 2" and "residual fraction") as a percentage of the total fluorescence. Results are means \pm S.D. from triplicate experiments.

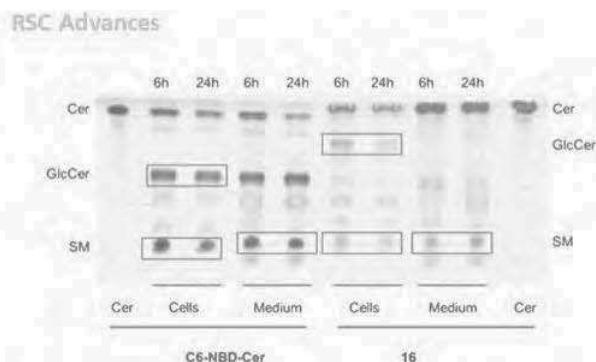


Fig. 10 Uptake and metabolism of the ceramide analogue **16** by CHO cells. Cells were incubated for the indicated times in the presence of 5 μ M of the analogue in DMEM medium supplemented with 1% foetal calf serum. Then, both cells and media were collected, lipids were extracted, separated by TLC and visualized.

ceramide derivative **19** (Fig. 9). This compound represents a potential probe to further develop a CERT binding assay relying on labelled streptavidin. A marked recognition of the biotinylated ceramide by CERT was recorded, comparable to that of the natural ligand.

Metabolism of the fluorescent probe **16**

To further illustrate the biological relevance of the fluorescent ceramide probe **16** we carried out metabolic studies. In order to assess the potential cytotoxicity of the compound, cells were treated with up to 50 μ M of **16** for 6 h, or with 5 μ M for 24 h. No significant alteration of cell viability was noticed under these conditions (data not shown). We then evaluated the metabolic fate of the fluorescent ceramide analogue **16** in intact cells from various origins (*i.e.* mouse melanoma B16F10, CHO (Chinese Hamster Ovary) and HEK293T (Human Embryonic Kidney)). The ability of the analogue **16** to be taken up by the cells and converted into GlcCer and SM was analysed. As illustrated in Fig. 10, the new fluorescent ceramide analogue **16** was able to penetrate CHO cells and to be transformed to both GlcCer and SM. The C6-NBD-Cer was rapidly converted to these more complex sphingolipids (70% of conversion after 6 h of incubation). Despite a somewhat slower transformation, the lipophilic analogue **16** gave after 24 h incubation a ratio of newly formed SM to GlcCer comparable to that observed with C6-NBD-Cer. As observed for the latter commercial probe, the biosynthesized fluorescent GlcCer and SM were partly recovered in the extracellular medium due to extraction of the membrane lipids by the proteins present in the medium. Similar findings were obtained using B16F10 or HEK293T cells (data not shown).

Enzymatic hydrolysis of the ceramide probe **16** into the corresponding ω -labelled fluorescent sphingosine derivative under the action of acid ceramidase was also experimentally evidenced. Indeed, incubation of the fluorescent ceramide analogue with a lysate of cells overexpressing acid ceramidase resulted in the release of fluorescently-labelled sphingosine; in contrast, a lysate of cells displaying a genetic deficiency of acid ceramidase, *i.e.* Farber disease cells, did not produce fluorescent sphingosine (Fig. 11).

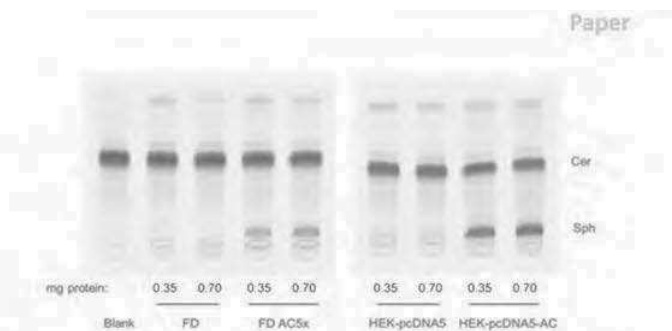


Fig. 11 Enzymatic hydrolysis of the ceramide analogue **16** by acid ceramidase. Lysates of the following cells were prepared: Farber disease (FD) fibroblasts that were transduced (AC5x) or not with a retroviral vector encoding human acid ceramidase; HEK293T that were transfected with a pcDNA5 empty vector or a pcDNA5 plasmid carrying the cDNA for human acid ceramidase (pcDNA5-AC). The indicated protein amounts of cell lysates were incubated for 2 h at 37 °C with the analogue suspended in a citrate-phosphate pH4 buffer. Then, lipids were extracted, separated by TLC and visualized.

Taken together, these results indicate that the new fluorescent ceramide analogue **16** undergoes key intracellular metabolic transformations expected for a ceramide, *i.e.* degradation into sphingosine and functionalisation at the C-1 hydroxyl group (conversion into GlcCer and SM). Notably, conversion of the ceramide probe **16** into the corresponding fluorescent SM derivative may indicate the possibility of an intracellular CERT-mediated inter-organelle trafficking.

Intracellular distribution of the fluorescent probe **16**

Finally we briefly studied the intracellular behaviour of the fluorescent ceramide **16**. Hanada and colleagues showed that the CERT-dependent ER-to-Golgi apparatus trafficking of an appropriate ceramide probe could be monitored by fluorescence microscopy.²⁶ According to these precedents, C6-NBD-Cer proved irrelevant in this context, due to spontaneous intermembrane transfer. On the other hand, C5-DMB-Cer allowed tracking of the CERT-dependent ceramide redistribution from various intracellular membranes, including ER, to the perinuclear region in wild-type CHO cells. Interestingly, this intracellular behaviour was altered in LY-A mutant CHO cells, defective in functional CERT, whereas it was restored to the wild-type level in the transfectant LY-A/hCERT cell line.

We first reproduced these experiments with commercially available probes. Thus, intact LY-A and LY-A/hCERT cells were prelabelled with C5-DMB-Cer (or C6-NBD-Cer, see ESI†) at 4 °C washed ($T = 0$ min) and chased at 33 °C ($T = 30$ min). As can be seen from Fig. 12, photomicrographs at $T = 0$ min showed a diffuse fluorescence characteristic of cytosolic reticular membranes labelling. When cells were warmed up at physiological temperature to trigger the energy-dependent CERT-mediated conversion of intracellular ceramide to SM, accumulation of the fluorescence in the perinuclear region, corresponding to ER-Golgi localisation, at $T = 30$ min was, as expected, less prominent in the CERT-deficient LY-A than in LY-A/hCERT. In contrast, the behaviour of C6-NBD-Cer was almost identical in both cell lines (see ESI†).

We then used the NBD-labelled ceramide analogue **16** under similar pulse-chase conditions (Fig. 13). We noticed that its

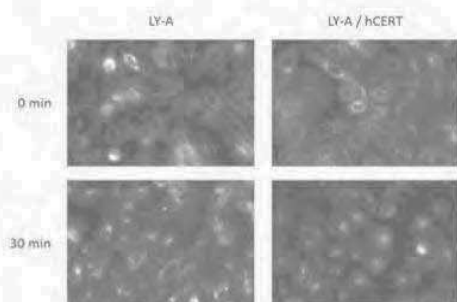


Fig. 12 Intracellular distribution of the C5-DMB-Cer. Intact LY-A and LY-A/hCERT cells were incubated with 1 μ M of C5-DMB-Cer at 4 $^{\circ}$ C for 30 min in culture media without serum, washed in PBS ($T = 0$ min) and incubated at 33 $^{\circ}$ C in presence of culture medium with 10% SVF for 30 min ($T = 30$ min). Live cells images were acquired using an inverted microscope fitted with camera equipped with X20 objective.

time- and energy-dependent intracellular ER-Golgi apparatus redistribution was markedly lower in the mutant LY-A cells than in the transfectant LY-A/hCERT. These experiments indicated that the probe **16** was not only efficiently recognised but also transferred by CERT in living cells, thus suggesting that it was able to closely mimic the intracellular behaviour of natural ceramide produced at the ER.

Conclusions

For the first time, the design of a probe optimised to assess the binding to CERT was addressed. A generic ceramide-based structure with a fluorophore on the terminal position of the C18 sphingosine backbone and variable acyl chain length was selected as a relevant candidate. Precursory molecular modelling study based on crystallographic structures of the START domain validated a possible interaction with the designed probe. In the resulting model, the sphingosine skeleton,

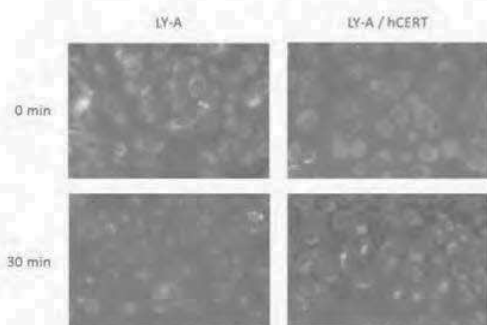


Fig. 13 Intracellular distribution of the fluorescent probe **16**. Intact LY-A and LY-A/hCERT cells were incubated with 5 μ M of **16** at 4 $^{\circ}$ C for 30 min in culture media without serum, washed in PBS ($T = 0$ min) and incubated at 33 $^{\circ}$ C in presence of culture medium with 10%SVF for 30 min ($T = 30$ min). Live cells images were acquired using an inverted microscope fitted with camera equipped with a X20 objective.

crossing a well-identified portal, leaves the fluorescent group free to point outside the binding cavity. Three different NBD-labelled ceramide analogues with C16, C6 and C2 amide fragment were prepared using an olefin cross-metathesis approach to build the sphingosine backbone. A strong contribution of the lipophilicity of the acyl chain to the protein recognition was observed. The best C16 derivative was further used to develop a binding assay useful to assess the recognition of a wide series of potential CERT ligands. In addition, the biological relevancy of the fluorescent probe **16** regarding the ceramide/SM metabolism was illustrated by means of metabolic and cellular imaging experiments. Finally an ω -biotinylated ceramide was synthesised and demonstrated to efficiently bind to the START domain, thus representing a new valuable tool for the screening-based identification of new CERT ligands as potential antagonists. Work along this line is currently under investigation in our laboratories.

Experimental

Reactions were monitored using Merck silica gel 60 F-254 precoated plates. Chromatograms were observed under UV light and/or were visualized by heating plates that were dipped in 10% phosphomolybdic acid in ethanol. Column chromatography was carried out with SDS 35–70 μ m flash silica gel. NMR spectroscopic data were obtained with Bruker Avance 300. Chemical shifts are quoted in parts per million (ppm) relative to residual solvent peak. Infrared (IR) spectra were recorded on a Perkin-Elmer FT-IR 1725X spectrometer. Mass spectrometry (MS) data were obtained on a ThermoQuest TSQ 7000 spectrometer. High-resolution mass spectra (HRMS) were performed on a ThermoFinnigan MAT 95 XL spectrometer. Optical rotations were measured on a JASCO P-2000 polarimeter. Melting points were determined in capillary with a Mettler Toledo Melting Point System MP50. Anhydrous solvents were obtained prior to use according to standard methods.⁴⁴ Recombinant CERT was purchased from Genway Biotech and recombinant START domain was purchased from Abcam, TALON[®] metal affinity resin was from Clontech, 1-stearyl-D-erythro-sphingosine, *N*-lignoceroyl-D-erythro-sphingosine and *N*-heptanoyl-sphingosylphosphorylcholine from Avanti polar lipids, Inc., C6-NBD-Cer from Santa Cruz Biotechnology, Inc. and C5-DMB-Cer from Molecular Probes. Fluorescence spectra were recorded with a Carey Eclipse spectrofluorometer equipped with a xenon lamp source and a Hamamatsu R928 photomultiplier tube.

Computational chemistry

Molecular graphics and some analyses were performed with the UCSF Chimera package.⁴⁵ Chimera is developed by the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco (supported by NIGMS P41-GM103311). The Protein structures were prepared (structure checks, rotamers, hydrogenation) using Accelrys Discovery Studio 3.0 client and UCSF Chimera 1.6.2 or 1.7 (Dock Prep without minimization). All the protein structures

described in the paper were structurally aligned with structure 2E3S set as reference and using UCSF Chimera Matchmaker.⁴⁶ The Ligand structures were extracted (SciTE text editor) from aligned protein structure or sketched using ChemAxon Marvin 5.5 and prepared (hybridization, hydrogenation) using Discovery Studio 3.0 client. The structure 2E3N (liganded with 6 CM compound) was chosen for molecular docking studies carried with Molegro Virtual Docker 5.5 software. The template docking was defined at 1.8 Angstrom of radius, using C16 ligand conformation from structure 2E3O. This docking template include (i) 3 hydrogen acceptors (2 hydroxyl and keto); (ii) 3 hydrogen donors (2 hydroxyl and nitrogen) and (iii) 38 atoms (C,N,O) for modelization of the overall shape of ceramid. 45 residues around cavity were set flexible using a tolerance of 0.99, a flexibility of 0.90 and softened potentials. 2000 steps were used for final minimization of lateral chains of residues and for backbone (default values). Moldock (mainly) or PLANTS (additional) were used for scoring.³⁷ Moldock SE was used as docking optimizer, Tabu clustering for generating the 20 poses by run. Docking poses were analysed using Molegro or UCSF Chimera software. The 2D interaction map (Fig. 3C) was produced using a compilation of data issued from different interaction analysis software (Molegro Virtual Docker, Accelrys Discovery Studio 3.0 client, in-house software). The position of some residue was modified for a better readability of the molecular interactions.

Synthetic chemistry

General procedure for the olefin cross metathesis. To a solution of vinyl derivative (1 eq.) and alkene (4 eq.) in degassed anhydrous CH_2Cl_2 (0.05 M) and under N_2 was added Grubbs-Hoveyda II catalyst (0.04 eq.). The reaction mixture was heated at reflux with stirring under N_2 for 5 h. The solution was cooled to room temperature and DMSO (50 eq.) was added. After a night of stirring, the solution was concentrated *in vacuo*.

General procedure for the cleavage of the *tert*-butyloxycarbonyl group. To a solution of Boc-protected amine (1 eq.) in CH_2Cl_2 (0.025 M) was added TFA (140 eq.) at 0 °C. After the reaction mixture was stirred at the same temperature for 1 h, saturated NaHCO_3 solution was very slowly added in several fractions and stirring was continued during 15 min. Phases were separated and aqueous layer was extracted with $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9.5 : 0.5). The organic layer was dried (Na_2SO_4) and concentrated *in vacuo*.

General procedure for the introduction of NBD group. A solution of 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-yl chloride (NBD-Cl) (1 eq.) in anhydrous THF (0.5 M) was added dropwise, under N_2 atmosphere at room temperature, to a stirred solution of the appropriate amine (1 eq.) and Et_3N (1.2 eq.) in anhydrous THF (1 M). The dark solution was stirred at room temperature with the exclusion of light for 20–24 h. The mixture was concentrated *in vacuo*.

15-azidopentadec-1-ene (8). To solution of alcohol 7 (2.0 g, 8.83 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (20 mL) at 0 °C under N_2 atmosphere was added Et_3N (1.84 mL, 13.25 mmol). After 15 min of stirring at the same temperature mesyl chloride (1.03 mL, 13.25 mmol) was added and the solution was stirred at 0

°C for 30 min then at room temperature for 23 h. The reaction was quenched by addition of water and the mixture was extracted three times with CH_2Cl_2 . The combined extracts were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The crude product was dissolved in DMF (20 mL) before NaN_3 (1.43 g, 22.1 mmol) was added at room temperature. After 24 h of stirring, water was added, and the resulting mixture was extracted with CH_2Cl_2 . The organic layers were combined, washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The crude material was purified by column chromatography on SiO_2 eluting with petroleum ether to give 8 (1.85 g, 84%) as a colorless oil. R_f 0.83 (EtOAc-Petroleum ether 2 : 8); δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 5.81 (ddt, 1H, $J = 16.9$ Hz, $J = 10.2$ Hz, $J = 6.7$ Hz, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 4.99 (dq, 1H, $J = 17.1$ Hz, $J = 1.7$ Hz, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 4.92 (ddt, 1H, $J = 10.2$ Hz, $J = 2.1$ Hz, $J = 1.2$ Hz, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 3.25 (t, 2H, $J = 6.9$ Hz, CH_2N_3), 2.04 (q, 2H, $J = 6.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 1.59 (qt, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH_2), 1.44–1.22 (m, 20H, CH_2); δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 138.7 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 113.6 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 51.0 (CH_2N_3), 33.3, 29.2, 29.1, 29.1, 29.0, 29.0, 28.7, 28.5, 28.4, 26.3 (12 CH_2).

***tert*-butyl pentadec-14-enylcarbamate (9).** To a solution of 8 (1.75 g, 6.97 mmol) in THF (21 mL), under N_2 atmosphere, at room temperature, was added Me_3P (8.37 mL, 8.37 mmol, 1 M in THF). After 2 h of stirring at 30 °C, the flask was cooled to –20 °C and a solution of Boc-ON (2.06 g, 8.37 mmol) in THF (9 mL) was added. After stirring for 20 h at room temperature, the mixture was diluted with CH_2Cl_2 and a solution of NaOH 2 M was added. After extraction several times with CH_2Cl_2 , the organic layers were combined, washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The crude material was purified by column chromatography on SiO_2 eluting with EtOAc : Petroleum ether (0.1 : 9.9) to give 9 (2.25 g, 99%) as a white solid. R_f 0.54 (EtOAc-Petroleum ether 1 : 9); δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 5.81 (ddt, 1H, $J = 16.9$ Hz, $J = 10.2$ Hz, $J = 6.6$ Hz, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 4.99 (ddt, 1H, $J = 17.1$ Hz, $J = 2.1$ Hz, $J = 1.6$ Hz, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 4.92 (ddt, 1H, $J = 10.2$ Hz, $J = 2.3$ Hz, $J = 1.2$ Hz, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 3.09 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz, CH_2NH), 2.03 (q, 2H, $J = 6.6$ Hz, CH_2), 1.60 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.4–1.2 (m, 22H, CH_2); δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 139.3 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 114.1 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 40.6 (CH_2NH), 33.8, 30.1, 29.6, 29.6, 29.6, 29.5, 29.3, 29.1, 28.9, 26.8 (12 CH_2), 28.4 (3 CH_3); m/z (HRMS, Electro Spray Ionisation (henceforth referred to as ESI)) 348.2878 ($M + \text{Na}^+$, $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{NO}_2\text{Na}$ requires 348.2878).

***N*-((2S,3R)-1,3-dihydroxypent-4-en-2-yl)palmitamide (3).** To a solution of NHBoc derivative 2 (187 mg, 0.86 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (15 mL) was added trifluoroacetic acid (1.9 mL) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h and solvents were evaporated. The trifluoroacetic acid salt derivative was dissolved in anhydrous CH_2Cl_2 (4 mL) under N_2 and Et_3N (145 μL , 1.03 mmol) was added at 0 °C. Then palmitoyl chloride (260 μL , 0.85 mmol) was introduced at the same temperature. After, the reaction mixture was stirred for 1 h, a saturated ammonium chloride solution was added, and the resulting mixture was extracted with CH_2Cl_2 . The organic layers were combined, washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The crude material was purified by column chromatography on SiO_2 eluting with CH_2Cl_2 -MeOH (10 : 0 to 9.5 : 1.5) to give 3 (183 mg, 68%) as a white solid. R_f 0.24 (CH_2Cl_2 -MeOH 9 : 1); $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ –17.0 (c 1,

CHCl_3); δ_{H} (300 MHz, CD_3OD) 5.88 (ddd, 1H, $J = 16.8$ Hz, $J = 10.2$ Hz, $J = 6.3$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.29 (dt, 1H, $J = 17.1$ Hz, $J = 1.8$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.16 (dt, 1H, $J = 10.5$ Hz, $J = 1.5$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4.15 (t, 1H, $J = 6.3$ Hz, CHOH), 3.89 (q, 2H, $J = 5.4$ Hz, CHNH), 3.75–3.60 (m, 2H, CH_2OH), 2.17–2.23 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 1.57–1.61 (m, 2H, CH_2), 1.20–1.40 (m, 24H, CH_2), 0.87 (m, 3H, CH_3); δ_{C} (75 MHz, CD_3OD) 138.7 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 116.5 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 73.4 (CHOH), 61.6 (CH_2OH), 55.8 (CHNH), 36.9 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 32.5, 30.3, 30.2, 30.1, 30.0, 29.9, 26.5, 23.2 (CH_2), 14.2 (CH_3); m/z (HRMS, ESI) 378.2979 ($\text{M} + \text{Na}^+$, $\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{NO}_3\text{Na}$ requires 378.2984).

tert-butyl ((16R,17S,E)-16,18-dihydroxy-17-palmitamidooctadec-14-en-1-yl)carbamate (10). Prepared from vinylserine derivative **3** (100 mg, 0.28 mmol) and olefin-NHBoc **9** (360 mg, 1.11 mmol) according to the general procedure for the olefin cross metathesis. The crude material was purified by column chromatography on SiO_2 eluting with CH_2Cl_2 -MeOH (10 : 0 to 9 : 1) to give **10** (108 mg, 70%) as a white solid. R_f 0.33 (CH_2Cl_2 -MeOH 9.5 : 0.5); mp 90–91 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -12.9$ (c 1.0, CHCl_3); $\nu_{\text{max}}(\text{film})/\text{cm}^{-1}$ 3354, 2917, 2848, 1684, 1615, 1532, 1467, 1365, 1272, 1251, 1172, 1048, 983, 719; δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 6.34 (d, 1H, $J = 6.9$ Hz, NHCO), 5.77 (dt, 1H, $J = 15.6$ Hz, $J = 6.6$ Hz, $\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 5.51 (dd, 1H, $J = 15.3$ Hz, $J = 6.3$ Hz, $\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 4.53 (s large, 1H, NHBoc), 4.29 (t, 1H, $J = 4.7$ Hz, CHOH), 4.1–3.9 (m, 2H, CHNH and CH_2OH), 3.69 (dd, 1H, $J = 10.7$ Hz, $J = 2.5$ Hz, CH_2OH), 3.08 (q, 2H, $J = 6.4$ Hz, CH_2NHBoc), 2.8–2.4 (bs, 2H, OH), 2.22 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2.04 (q, 2H, $J = 6.8$ Hz, $\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 1.8–1.6 (m, 2H, CH_2), 1.47 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.5–1.1 (m, 46H, CH_2), 0.87 (m, 3H, CH_3); δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 174.0 ($\text{C}=\text{O}$), 155.0 ($\text{C}=\text{O}$), 134.1 ($\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 128.8 ($\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 79.0 (C_{IV}), 74.5 (CHOH), 62.4 (CH_2OH), 54.5 (CHNH), 40.6 (CH_2NHBoc), 36.8 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 32.3 ($\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 31.9, 30.0, 29.7, 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.4, 29.3, 29.3, 29.2, 29.1, 29.1, 26.8, 25.7, 22.7 (24 CH_2), 28.4 (CH_3Boc), 14.1 (CH_3); m/z (HRMS, CI) 653.5847 ($\text{M} + \text{H}^+$, $\text{C}_{39}\text{H}_{77}\text{N}_2\text{O}_5$ requires 653.5832).

N-((2S,3R,E)-18-amino-1,3-dihydroxyoctadec-4-en-2-yl)palmitamide (13). Prepared from olefin derivative **10** (40.0 mg, 0.06 mmol) according to the general procedure for cleavage of the *tert*-butyloxycarbonyl group. The crude material was purified by column chromatography on SiO_2 eluting with CH_2Cl_2 -MeOH-EtOH- NH_4OH (15 : 0.5 : 1 : 0.5) to give **13** (20.0 mg, 60%) as a white solid. R_f 0.29 (CH_2Cl_2 -MeOH-EtOH- NH_4OH 15 : 0.5 : 1 : 0.5); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -0.28$ (c 1.0, CHCl_3); δ_{H} (300 MHz, CD_3OD) 5.70 (dt, 1H, $J = 15.3$ Hz, $J = 6.6$ Hz, $\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 5.46 (dd, 1H, $J = 15.3$ Hz, $J = 7.2$ Hz, $\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 4.05 (t, 1H, $J = 7.2$ Hz, CHOH), 3.86 (m, 1H, CHNH), 3.70 (m, 2H, CH_2OH), 2.71 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, CH_2NH_2), 2.19 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2.04 (q, 2H, $J = 6.6$ Hz, $\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 1.6–1.3 (m, 48H, CH_2), 0.90 (m, 3H, CH_3); δ_{C} (75 MHz, CD_3OD) 178.4 ($\text{C}=\text{O}$), 134.5 ($\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 131.1 ($\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 73.4 (CHOH), 62.1 (CH_2OH), 56.5 (CHNH), 41.8 (CH_2NH_2), 37.1 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 33.2 ($\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 32.9, 32.0, 30.6, 30.6, 30.5, 30.5, 30.5, 30.5, 30.4, 30.3, 30.3, 30.2, 27.7, 26.9, 23.5 (24 CH_2), 14.2 (CH_3); m/z (HRMS, ESI) 553.5305 ($\text{M} + \text{H}^+$, $\text{C}_{34}\text{H}_{69}\text{N}_2\text{O}_3$ requires 553.5308).

N-((2S,3R,E)-1,3-dihydroxy-18-((7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-yl)amino)octadec-4-en-2-yl)palmitamide (16). Prepared from amine **13** (50.0 mg, 0.09 mmol) according to the general

procedure for coupling with NBD group. The crude material was purified by column chromatography on SiO_2 eluting with CH_2Cl_2 -MeOH (10 : 0 to 9.9 : 0.1) to give **16** (43.0 mg, 66%) as an orange solid. R_f 0.41 (CH_2Cl_2 -MeOH 9 : 1); mp 76–77 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -17.3$ (c 1.0, CHCl_3); $\nu_{\text{max}}(\text{film})/\text{cm}^{-1}$ 3322, 3268, 3093, 3070, 2961, 2919, 2850, 1645, 1622, 1558, 1505, 1465, 1260, 1107, 1026, 802; δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 8.50 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, CH_{NBD}), 6.39 (m, 1H, CH_2NH), 6.28 (d, 1H, $J = 6.9$ Hz, NHCO), 6.17 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, CH_{NBD}), 5.78 (dt, 1H, $J = 15.0$ Hz, $J = 6.9$ Hz, $\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 5.53 (dd, 1H, $J = 15.0$ Hz, $J = 6.3$ Hz, $\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 4.33 (bs, 1H, CHOH), 4.1–3.8 (m, 2H, CHNH and CH_2OH), 3.71 (m, 1H, CH_2OH), 3.49 (q, 2H, $J = 6.6$ Hz, CH_2NHNBD), 2.23 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2.05 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 2.0–1.0 (m, 48H, CH_2), 0.87 (m, 3H, CH_3); δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 174.0 ($\text{C}=\text{O}$), 144.3 (C_{IV}), 136.6 (CH_{NBD}), 134.1 ($\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 128.9 ($\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 98.5 (CH_{NBD}), 74.6 (CHOH), 62.5 (CH_2OH), 54.5 (CHNH), 44.0 (CH_2NHNBD), 36.8 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 31.9 ($\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 32.2, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.3, 29.1, 29.1, 29.0, 28.5, 26.9, 25.8, 22.7 (24 CH_2), 14.1 (CH_3); m/z (HRMS, ESI) 716.5332 ($\text{M} + \text{H}^+$, $\text{C}_{40}\text{H}_{76}\text{N}_5\text{O}_6$ requires 716.5326).

N-((2S,3R,E)-1,3-dihydroxy-18-(5-(2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)pentanamido)octadec-4-en-2-yl)palmitamide (19). Under nitrogen atmosphere, biotin (50.0 mg, 0.20 mmol) was dissolved in dry DMF (1.5 mL) then pentafluorophenol (50.0 mg, 0.20 mmol) and dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 64.0 mg, 0.31 mmol) were added at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature during 16 h. Then the dicyclohexyl urea formed was removed by filtration and amine **13** (30.0 mg, 0.05 mmol) and Et_3N (34 μL , 0.25 mmol) were added. After 20 h of stirring at room temperature, the mixture was reduced under vacuum and purification by column chromatography on SiO_2 eluting with CH_2Cl_2 -MeOH (10 : 0 to 9 : 1) gave **19** (26.0 mg, 60%) as a beige solid. R_f 0.11 (CH_2Cl_2 -MeOH 9 : 1); mp 109–110 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -18.4$ (c 1.0, CHCl_3); $\nu_{\text{max}}(\text{film})/\text{cm}^{-1}$ 3308, 2916, 2849, 2476, 2418, 2361, 1684, 1633, 1552, 1461, 1202, 1135, 1048, 1033, 1020, 970, 800, 720; δ_{H} (300 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) 7.28 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, CH_2NH), 5.34 (dt, 1H, $J = 15.0$ Hz, $J = 6.9$ Hz, $\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 5.2–5.0 (m, 2H, NHCO and $\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 4.13 (dd, 1H, $J = 7.2$ Hz, $J = 5.1$ Hz, $\text{CH}_{\text{Biotine}}$), 3.94 (dd, 1H, $J = 7.5$ Hz, $J = 4.2$ Hz, $\text{CH}_{\text{Biotine}}$), 3.73 (t, 1H, $J = 6.5$ Hz, CHOH), 3.62 (m, 1H, CHNH), 3.38 (dd, 1H, $J = 10.8$ Hz, $J = 5.1$ Hz, CH_2OH), 3.28 (dd, 1H, $J = 11.0$ Hz, $J = 4.0$ Hz, CH_2OH), 2.9–2.7 (m, 5H, SCH , CH_2NH and CH_2), 2.55 (dd, 1H, $J = 12.6$ Hz, $J = 4.8$ Hz, SCH_2), 2.35 (d, 1H, $J = 13.5$ Hz, SCH_2), 1.82 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 1.65 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 1.4–0.9 (m, 52H, CH_2), 0.51 (m, 3H, CH_3); δ_{C} (75 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) 175.8, 175.3, 175.1 (3 $\text{C}=\text{O}$), 134.6 ($\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 130.2 ($\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 73.5 (CHOH), 62.8 ($\text{CH}_{\text{Biotine}}$), 62.0 (CH_2OH), 61.0 ($\text{CH}_{\text{Biotine}}$), 56.5 (SCH), 55.9 (CHNH), 47.4 (CH_2NH), 40.9 (SCH_2), 40.2 (CH_2), 37.1, 36.4 (2 CH_2CO), 33.0 ($\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 36.5, 32.6, 30.4, 30.3, 30.3, 30.2, 30.2, 30.2, 30.1, 30.0, 30.0, 29.9, 29.5, 29.2, 28.9, 27.6, 26.6, 26.4, 23.3 (26 CH_2), 14.4 (CH_3); m/z (HRMS, ESI) 801.5884 ($\text{M} + \text{Na}^+$, $\text{C}_{44}\text{H}_{82}\text{N}_4\text{NaO}_5\text{S}$ requires 801.5904).

N-((2S,3R)-1,3-dihydroxypent-4-en-2-yl)hexanamide (4). To a solution of compound **2** (100 mg, 0.46 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (8 mL) was added trifluoroacetic acid (1 mL) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h and solvents were evaporated. The trifluoroacetic acid salt derivative was

dissolved in anhydrous CH_2Cl_2 (3 mL) under N_2 was added Et_3N (75 μL , 0.51 mmol) at 0°C . Then hexanoyl chloride (70 μL , 0.51 mmol) was introduced at the same temperature. After, the reaction mixture was stirred for 1 h, a saturated ammonium chloride solution was added, and the resulting mixture was extracted with CH_2Cl_2 . The organic layers were combined, washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated in vacuum. The crude material was purified by column chromatography on SiO_2 eluting with CH_2Cl_2 -MeOH (10 : 0 to 9 : 1) to give **4** (63.0 mg, 64%) as an amorphous solid. R_f 0.55 (CH_2Cl_2 -MeOH 9 : 1); $[\alpha]_D^{20}$ -1.4 (*c* 0.5, CHCl_3); $\nu_{\text{max}}(\text{film})/\text{cm}^{-1}$ 3295, 3090, 2953, 2929, 2871, 1642, 1543, 1465, 1054, 711; δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 6.36 (d, 1H, J = 6.6 Hz, NHCO), 5.93 (ddd, 1H, J = 17.2 Hz, J = 10.5 Hz, J = 5.4 Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.39 (dt, 1H, J = 17.2 Hz, J = 1.5 Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.27 (dt, 1H, J = 10.6 Hz, J = 1.4 Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4.40–4.34 (m, 1H, CHOH), 3.70–3.90 (m, 2H, CHNH and CH_2OH), 3.75–3.65 (m, 1H, CH_2OH), 3.1–2.6 (bs, 2H, OH), 2.27–2.19 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 1.70–1.55 (m, 2H, CH_2), 1.40–1.25 (m, 4H, CH_2), 0.89 (m, 3H, CH_3); δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 174.1 ($\text{C}=\text{O}$), 137.3 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 116.6 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 74.6 (CHOH), 62.2 (CH_2OH), 54.0 (CHNH), 36.7 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 31.4, 25.4, 22.4 (CH_2), 13.9 (CH_3); m/z (HRMS, CI) 216.1593 ($\text{M} + \text{H}^+$, $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{NO}_3$ requires 216.1600).

tert-butyl (16R,17S,E)-17-hexanamido-16,18-dihydroxyoctadec-14-enylcarbamate (11). Prepared from vinylserine derivative **4** (100 mg, 0.47 mmol) and olefin-NHBoc **9** (500 mg, 1.86 mmol) according to the general procedure for the olefin cross metathesis. The crude material was purified by column chromatography on SiO_2 eluting with CH_2Cl_2 -MeOH (10 : 0 to 9 : 1) to give **11** (30.0 mg, 55%) as a brown oil. R_f 0.42 (CH_2Cl_2 -MeOH 9 : 1); $[\alpha]_D^{20}$ -4.0 (*c* 1.0, CHCl_3); $\nu_{\text{max}}(\text{film})/\text{cm}^{-1}$ 3294, 2917, 2850, 1643, 1545, 1465, 1054, 720; δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 6.34 (d, 1H, J = 6.9 Hz, NHCO), 5.76 (dt, 1H, J = 15.4 Hz, J = 6.6 Hz, $\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 5.50 (dd, 1H, J = 15.4 Hz, J = 6.3 Hz, $\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 4.54 (bs, 1H, NHBoc), 4.28 (m, 1H, CHOH), 4.0–3.8 (m, 2H, CHNH and CH_2OH), 3.68 (m, 1H, CH_2OH), 3.4–3.25 (m, 2H, OH), 3.08 (q, 2H, J = 6.4 Hz, CH_2NHBoc), 2.21 (t, 2H, J = 7.6 Hz, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2.04 (q, 2H, J = 6.8 Hz, $\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 1.7–1.5 (m, 2H, CH_2), 1.43 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.4–1.1 (m, 26H, CH_2), 0.87 (m, 3H, CH_3); δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 173.4 ($\text{C}=\text{O}$), 156.1 ($\text{C}=\text{O}$), 134.0 ($\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 128.8 ($\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 79.1 (C_{IV}), 74.4 (CHOH), 62.4 (CH_2OH), 54.5 (CHNH), 40.6 (CH_2NHBoc), 36.8 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 32.3 ($\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 31.9, 30.0, 29.7, 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.4, 29.3, 29.3, 29.2, 29.1, 29.1, 26.8, 25.7, 22.7 (14CH_2), 28.4 (CH_3Boc), 14.1 (CH_3); m/z (HRMS, ESI) 513.4264 ($\text{M} + \text{H}^+$, $\text{C}_{29}\text{H}_{57}\text{N}_2\text{O}_5$ requires 513.4267).

N-((2S,3R,E)-18-amino-1,3-dihydroxyoctadec-4-en-2-yl)hexanamide (14). Prepared from olefin derivative **11** (30.0 mg, 0.06 mmol) according to the general procedure for cleavage of the *tert*-butyloxycarbonyl group. The crude material was purified by column chromatography on SiO_2 eluting with CH_2Cl_2 -MeOH-EtOH- NH_4OH (15 : 0.5 : 1 : 0.5) to give **14** (16.0 mg, 66%) as a white solid. R_f 0.16 (CH_2Cl_2 -MeOH-EtOH- NH_4OH 15 : 0.5 : 1 : 0.5); mp 98–99 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{20}$ -5.2 (*c* 0.5, CHCl_3); $\nu_{\text{max}}(\text{film})/\text{cm}^{-1}$ 3369, 2977, 2930, 2854, 1712, 1504, 1392, 1366, 1247, 1167, 1059, 852, 780; δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 6.56 (d, 1H, J = 7.2 Hz, NHCO), 5.72 (dt, 1H, J = 14.7 Hz, J = 6.6 Hz,

$\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 5.45 (dd, 1H, J = 15.6 Hz, J = 6.6 Hz, $\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 4.18 (t, 1H, J = 4.5 Hz, CHOH), 3.9–3.7 (m, 2H, CHNH and CH_2OH), 3.61 (m, 1H, CH_2OH), 2.7–2.5 (m, 6H, CH_2NH_2 , 2 \times OH , NH_2), 2.17 (t, 2H, J = 7.2 Hz, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2.00 (q, 2H, J = 6.9 Hz, $\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 1.57 (m, 2H, CH_2), 1.4–1.1 (m, 26H, CH_2), 0.84 (m, 3H, CH_3); δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 174.3 ($\text{C}=\text{O}$), 133.9 ($\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 128.7 ($\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 73.7 (CHOH), 61.9 (CH_2OH), 54.5 (CHNH), 48.8 (CH_2NH_2), 36.6 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 32.2, 31.8, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.4, 29.3, 29.3, 29.2, 29.2, 29.1, 25.7, 22.6 (15CH_2), 14.0 (CH_3); m/z (HRMS, ESI) 412.3740 ($\text{M} + \text{H}^+$, $\text{C}_{24}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_3$ requires 412.3743).

N-((2S,3R,E)-1,3-dihydroxy-18-((7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-yl)amino)octadec-4-en-2-yl)hexanamide (17). Prepared from amine **14** (16.0 mg, 0.04 mmol) according to the general procedure for coupling with NBD group. The crude material was purified by column chromatography on SiO_2 eluting with CH_2Cl_2 -MeOH (10 : 0 to 9 : 1) to give **17** (14.0 mg, 62%) as an orange solid. R_f 0.39 (CH_2Cl_2 -MeOH 9 : 1); mp 63–64 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{20}$ -15.0 (*c* 1.0, CHCl_3); $\nu_{\text{max}}(\text{film})/\text{cm}^{-1}$ 3357, 2979, 2687, 2488, 1704, 1519, 1455, 1476, 1393, 1367, 1249, 1163, 1059, 850, 789; δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 8.50 (d, 1H, J = 8.4 Hz, CH_{NBD}), 6.45 (m, 1H, CH_2NH), 6.29 (d, 1H, J = 7.5 Hz, NHCO), 6.17 (d, 1H, J = 8.7 Hz, CH_{NBD}), 5.78 (dt, 1H, J = 14.4 Hz, J = 6.0 Hz, $\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 5.53 (dd, 1H, J = 15.3 Hz, J = 6.3 Hz, $\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 4.32 (dd, 1H, J = 5.1 Hz, J = 3.9 Hz, CHOH), 4.0–3.9 (m, 2H, CHNH and CH_2OH), 3.71 (dd, 1H, J = 10.5 Hz, J = 2.7 Hz, CH_2OH), 3.49 (q, 2H, J = 6.3 Hz, CH_2NHNBD), 2.23 (t, 2H, J = 7.2 Hz, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2.05 (q, 2H, J = 6.6 Hz, $\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 1.81 (qt, 2H, J = 6.9 Hz, CH_2), 1.63 (m, 2H, CH_2), 1.6–1.1 (m, 24H, CH_2), 0.87 (m, 3H, CH_3); δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 174.0 ($\text{C}=\text{O}$), 144.3, 143.9 (2 \times C_{IV}), 136.5 (CH_{NBD}), 134.1 ($\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 128.8 ($\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 98.5 (CH_{NBD}), 74.7 (CHOH), 62.5 (CH_2OH), 54.5 (CHNH), 44.0 (CH_2NHNBD), 36.8 (CH_2CO), 32.2, 31.9, 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.3, 29.0, 28.4, 26.9, 25.7, 22.7 (16CH_2), 14.1 (CH_3); m/z (HRMS, ESI) 598.3597 ($\text{M} + \text{Na}^+$, $\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_6\text{Na}$ requires 598.3581).

N-((2S,3R)-1,3-dihydroxypent-4-en-2-yl)acetamide (5). To a solution of compound **2** (268 mg, 1.23 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (21 mL) was added trifluoroacetic acid (2.7 mL) at 0°C . The reaction mixture was stirred at 0°C for 1 h and solvent were evaporated. The trifluoroacetic acid salt derivative was dissolved in saturated aqueous NaHCO_3 (2.85 mL) and MeOH (8.5 mL). Then acetic anhydride (127 μL , 1.36 mmol) was slowly added. The mixture was stirred at room temperature for 30 min and then concentrated. The crude material was purified by column chromatography on SiO_2 eluting with CH_2Cl_2 -MeOH (10 : 0 to 9 : 1) to give **5** (100 mg, 51%) as a colorless oil. R_f 0.23 (CH_2Cl_2 -MeOH 8 : 2); $[\alpha]_D^{20}$ -4.0 (*c* 1.5, EtOH); $\nu_{\text{max}}(\text{film})/\text{cm}^{-1}$ 3350, 3087, 2986, 2938, 2873, 1681, 1530, 1451, 1281, 1164, 1055, 1019; δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 7.00 (d, 1H, J = 7.8 Hz, NHCO), 5.84 (ddd, 1H, J = 16.5 Hz, J = 10.8 Hz, J = 5.4 Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.30 (d, 1H, J = 17.1 Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.18 (d, 1H, J = 10.5 Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4.23 (m, 1H, CHOH), 3.85 (m, 1H, CHNH), 3.79 (dd, 1H, J = 11.7 Hz, J = 4.2 Hz, CH_2OH), 3.61 (dd, 1H, J = 11.4 Hz, J = 3.3 Hz, CH_2OH), 1.97 (s, 3H, CH_3); δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 171.7 ($\text{C}=\text{O}$), 137.1 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 116.4 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 73.5 (CHOH), 61.4 (CH_2OH), 54.4 (CHNH), 22.9

(CH₃); *m/z* (HRMS, CI) 160.0969 (M + H⁺, C₇H₁₄NO₃ requires 160.0974).

tert-butyl ((16R,17S,E)-17-acetamido-16,18-dihydroxyoctadec-14-en-1-yl)carbamate (12). Prepared from vinylserine derivative **5** (100 mg, 0.63 mmol) and olefin-NHBoc **9** (818 mg, 2.52 mmol) according to the general procedure for the olefin cross metathesis. The crude material was purified by column chromatography on SiO₂ eluting with CH₂Cl₂-MeOH (10 : 0 to 9.5 : 0.5) to give **12** (100 mg, 35%) as a brown oil. *R*_f 0.37 (CH₂Cl₂-MeOH 9 : 1); [α]_D²⁰ -7.3 (c 0.50, CHCl₃); ν_{max}(film)/cm⁻¹ 3293, 2953, 2917, 2850, 1643, 1547, 1472, 1054, 720; δ_H (300 MHz, CDCl₃) 6.37 (d, 1H, *J* = 5.6 Hz, NHCO), 5.78 (dt, 1H, *J* = 15.4 Hz, *J* = 6.8 Hz, CH=CHCH₂), 5.53 (dd, 1H, *J* = 15.6 Hz, *J* = 6.3 Hz, CH=CHCH₂), 4.60–4.45 (s large, 1H, NHBoc), 4.32 (m, 1H, CHOH), 3.96 (dd, 1H, *J* = 11.1 Hz, *J* = 3.4 Hz, CH₂OH), 3.90 (m, 1H, CHNH), 3.70 (dd, 1H, *J* = 10.9 Hz, *J* = 2.7 Hz, CH₂OH), 3.09 (q, 2H, *J* = 6.5 Hz, CH₂NHBoc), 3.0–2.7 (bs, 2H, 2 × OH), 2.06 (q, 2H, *J* = 6.2 Hz, CH=CHCH₂), 2.04 (s, 3H, CH₃), 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.3–1.2 (m, 22H, CH₂); δ_C (75 MHz, CDCl₃) 170.7 (C=O), 156.0 (C=O), 134.1 (CH=CHCH₂), 128.8 (CH=CHCH₂), 79.1 (C_{IV}), 74.7 (CHOH), 62.4 (CH₂OH), 54.4 (CHNH), 40.6 (CH₂NHBoc), 32.2, 30.0, 29.5, 29.5, 29.4, 29.2, 29.1, 29.0, 26.8 (12CH₂), 28.4 (CH₃Boc), 23.4 (CH₃); *m/z* (HRMS, CI) 457.3663 (M + H⁺, C₂₅H₄₉N₂O₅ requires 457.3641).

N-((2S,3R,E)-18-amino-1,3-dihydroxyoctadec-4-en-2-yl)acetamide (15). Prepared from olefin derivative **12** (38.0 mg, 0.08 mmol) according to the general procedure for cleavage of the *tert*-butoxycarbonyl group. The crude material was purified by column chromatography on SiO₂ eluting with CH₂Cl₂-MeOH-EtOH-NH₄OH (15 : 0.5 : 1 : 0.5) to give **15** (18.0 mg, 60%) as a colourless oil. *R*_f 0.13 (CH₂Cl₂-MeOH-EtOH-NH₄OH 15 : 0.5 : 1 : 0.5); [α]_D²⁰ -12.3 (c 0.35, EtOH); ν_{max}(film)/cm⁻¹ 3291, 2953, 2917, 2850, 1640, 1548, 1463, 1054, 719; δ_H (300 MHz, CD₃OD) 5.70 (dtd, 1H, *J* = 15.0 Hz, *J* = 6.7 Hz, *J* = 0.6 Hz, CH=CHCH₂), 5.47 (ddt, 1H, *J* = 15.3 Hz, *J* = 7.3 Hz, *J* = 1.2 Hz, CH=CHCH₂), 4.07 (t, 1H, *J* = 6.9 Hz, CHOH), 3.91–3.83 (m, 1H, CHNH), 3.71–3.65 (m, 2H, CH₂OH), 2.65 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH₂NH₂), 2.04 (q, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH=CHCH₂), 1.95 (s, 3H, CH₃C=O), 1.55–1.25 (m, 22H, CH₂); δ_C (75 MHz, CD₃OD) 173.4 (C=O), 134.7 (CH=CHCH₂), 131.2 (CH=CHCH₂), 73.7 (CHOH), 62.2 (CH₂OH), 57.1 (CHNH), 42.3 (CH₂NH₂), 33.4, 30.8, 30.8, 30.7, 30.7, 30.6, 30.5, 30.3, 28.0 (12CH₂), 22.9 (CH₃); *m/z* (HRMS, CI) 357.3128 (M + H⁺, C₂₀H₄₁N₂O₃ requires 357.3117).

N-((2S,3R,E)-1,3-dihydroxy-18-((7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-yl)amino)octadec-4-en-2-yl)acetamide (18). Prepared from amine **15** (50.0 mg, 0.14 mmol) according to the general procedure for coupling with NBD group. The crude material was purified by column chromatography on SiO₂ eluting with CH₂Cl₂-MeOH (10 : 0 to 9.5 : 0.5) to give **18** (30.0 mg, 51%) as an orange oil. *R*_f 0.60 (CH₂Cl₂-MeOH 8.5 : 1.5); [α]_D²⁰ -5.5 (c 0.25, CHCl₃); ν_{max}(film)/cm⁻¹ 3305, 3076, 2926, 2853, 2706, 1674, 1621, 1585, 1529, 1297, 1243, 1202, 1040, 835, 721; δ_H (300 MHz, CDCl₃) 8.49 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, CH_{NBD}), 6.46 (t, 1H, *J* = 4.8 Hz, NHNBD), 6.38 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz, NHCO), 6.17 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, CH_{NBD}), 5.78 (dtd, 1H, *J* = 15.4 Hz, *J* = 6.8 Hz, *J* = 0.6 Hz, CH=CHCH₂), 5.53 (ddt, 1H, *J* = 15.5 Hz, *J* = 6.3 Hz, *J* = 1.1 Hz, CH=CHCH₂), 4.34 (dd, 1H, *J* = 5.0 Hz, *J* = 4.2 Hz, CHOH), 3.97 (dd, 1H, *J* = 11.1 Hz, *J* = 3.6 Hz, CH₂OH), 3.91 (dq, 1H, *J* =

7.4 Hz, *J* = 3.7 Hz, CHNH), 3.71 (dd, 1H, *J* = 11.0 Hz, *J* = 3.0 Hz, CH₂OH), 3.49 (q, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH₂NHNBD), 2.05 (q, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH=CHCH₂), 2.05 (s, 3H, CH₃C=O), 1.81 (qt, 2H, *J* = 7.1 Hz, CH₂), 1.6–1.2 (m, 20H, CH₂); δ_C (75 MHz, CDCl₃) 170.8 (C=O), 144.3, 144.0 (2 × C_{IV}), 136.5 (CH_{NBD}), 134.1 (CH=CHCH₂), 128.8 (CH=CHCH₂), 123.8 (C_{IV}), 98.5 (CH_{NBD}), 74.7 (CHOH), 62.4 (CH₂OH), 54.4 (CHNH), 44.0 (CH₂NHNBD), 32.2, 29.5, 29.4, 29.3, 29.1, 29.0, 29.0, 28.4, 26.9 (11CH₂), 23.4 (CH₃); *m/z* (HRMS, CI) 542.2944 (M + Na⁺, C₂₆H₄₁N₅O₆Na requires 542.2955).

Biology

Binding assays. *Binding assay of compound 16, C6-NBD-Cer and C5-DMB-Cer to CERT and START domain.* For each binding assay, 200 pmol of recombinant CERT (14.2 μg, 25 μL of a 0.57 mg mL⁻¹ commercial solution) or START domain (6.5 μg, 13 μL of a 0.5 mg mL⁻¹ commercial solution) were dissolved in Tris-buffered saline solution (TBS) (34 μL and 46 μL respectively) in an Eppendorf tube. For a negative control, TBS (total volume: 59 μL) was added in place of the proteins. The fluorescent probe (**16**, **17**, **18**, C6-NBD-Cer or C5-DMB-Cer) (100 pmol, 2 μL of 0.05 mM ethanolic stock solution) and TBS (30 μL) were added to the tube and the mixture was incubated at 37 °C for 30 min. Then TALON[®] metal affinity resin (30 μL of 50% (v/v) pre-equilibrated with wash buffer) was added to the mixture and incubated for 10 min at room temperature with rotary shaking. After centrifugation (14 000 × g, 30 s), the supernatant was collected as the “free fraction”. For washing, the resin was suspended in TBS (75 μL) containing 10 mM imidazole, and after centrifugation (14 000 × g, 30 s), the supernatant was collected as the “wash fraction 1”. This washing step was repeated to give the “wash fraction 2”. To liberate the protein bound to the TALON[®] resin, the resin was suspended in TBS (75 μL) containing 250 mM imidazole and incubated for 5 min at room temperature. After centrifugation (14 000 × g, 30 s), the supernatant was collected as the “bound fraction”. A solution of chloroform/methanol (1 : 2 (v/v), 3.75-fold volume of each fraction) was then added to each collected fraction, mixed and centrifuged (14 000 × g, 30 s). Finally, to retrieve residual fluorophores non-specifically bound to the resin and tube, TBS (85 μL) and chloroform/methanol mixture (1 : 2 (v/v), 375 μL) were added to the resin in the tube, mixed, and centrifuged (14 000 × g, 30 s). The supernatant was collected as the “residual fraction”. For each fraction, the fluorescence was quantified with a Cary Eclipse spectrofluorimeter (DMB: excitation at 480 nm; emission at 515 nm and NBD: excitation at 465 nm; emission at 530 nm).

Binding assay of compound 16 to START domain in the presence of a competitor. 200 pmol of START domain (6.5 μg, 13 μL of a 0.5 mg mL⁻¹ commercial solution) were dissolved in TBS (46 μL) in an Eppendorf tube. The competitor (200 pmol, 2 μL of 0.1 mM ethanolic stock solution or, in case of the dose-response experiments, 2–2000 pmol, 2 μL of 0.001–1 mM ethanolic stock C18-ceramide solution) and TBS (30 μL) were added to the tube and the mixture was incubated at 37 °C for 30 min. The fluorescent probe **16** (200 pmol, 2 μL of 0.1 mM ethanolic stock solution) and TBS (30 μL) were added to the tube and the mixture was again incubated at 37 °C for 30 min.

Then TALON[®] metal affinity resin (30 μ L of 50% (v/v) pre-equilibrated with wash buffer) was added to the mixture and incubated for 10 min at room temperature with rotary shaking. From that point, the same protocol as for the binding assay without competitor was applied (*vide supra*) and the fluorescence of each fraction was quantified with a Cary Eclipse spectrofluorimeter (NBD: excitation at 465 nm; emission at 530 nm).

Metabolism experiments. Cultured cells including B16F10 mouse melanoma, Chinese hamster ovary (CHO) and human embryonic kidney (HEK293T) cells, were incubated with an ethanolic solution of fluorescent ceramide analogues (final concentration of ceramide 5 μ M; final ethanol concentration 0.1%). After the indicated times, cells and media were collected and lipids were extracted using chloroform and methanol. The lipid extracts were analysed by thin-layer chromatography (TLC) using chloroform/methanol/ammonia/water (70/30/4/1, by vol.) as developing solvent. Fluorescent lipids were detected under a UV lamp and quantified using a Typhoon imager.

In vitro ceramidase assay. Cell lysates were prepared from Farber disease (FD) fibroblasts that were transduced (AC5x) or not with a retroviral vector encoding human acid ceramidase.⁴⁷ Also, lysates were prepared from HEK293T cells that were transiently transfected with a pcDNA5 empty vector or a pcDNA5 plasmid carrying the cDNA for human acid ceramidase (pcDNA5-AC). Cell lysates were incubated for 2 h at 37 °C with the fluorescent ceramide analogue (75 μ M) suspended in a detergent mixture containing Triton X-100 (0.025%), Tween 20 (0.01%), Na cholate (0.04%) and 0.125 M citrate-phosphate pH 4 buffer. Then, lipids were extracted, separated by TLC using chloroform/methanol/ammonia (90/10/1, by vol.) as developing solvent, and visualized as described above.

Imaging. Cell culture. CHO LY-A mutant and LY-A/hCERT cell lines, obtained from the laboratory of Prof. T. Levade, were cultured in DMEM/Glutamax supplemented with 10% foetal calf serum in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. G418 (0.4 mg ml⁻¹) was added to the culture media for the LY-A/hCERT CHO cells.

Cell labelling. Cells were seeded in Lab-Tek chamber slides 24 h before labelling. Cells were incubated with the indicated concentrations of C6-NBD-Cer, C5-DMB-Cer or the NBD-labelled ceramide analogue **16** at 4 °C for 30 min in culture media without serum. Cells were then washed in PBS (T = 0) and incubated at 33 °C in the presence of culture medium with 10% serum for additional 30 min.

Image acquisition and analysis. Live cells images were acquired using an inverted microscope (Axiovert, Zeiss), fitted with a Roper COOLsnap ES CCD camera. Cells were imaged by using a x20 objective (NA 0.5) and a FITC/GFP filter set. Images were processed using Metamorph and ImageJ softwares.

Acknowledgements

We are grateful to Profs. Adam Daïch and Dusan Berkes for a generous gift of HPA derivatives **20** and **21**. The ITAV imaging facility is thanked. The financial support by CNRS, INSERM, Université Paul Sabatier and ANR (SphingoDR) is gratefully acknowledged.

References

- 1 Y. A. Hannun and L. M. Obeid, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2008, **9**, 139.
- 2 A. Morales, H. Lee, F. M. Goni, R. Kolesnick and J. C. Fernandez-Checa, *Apoptosis*, 2007, **12**, 923.
- 3 F. M. Goni and A. Alonso, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 2009, **1788**, 169.
- 4 C. F. Snook, J. A. Jones and Y. A. Hannun, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids*, 2006, **1761**, 927.
- 5 O. Cuvillier, G. Pirianov, B. Kleuser, P. G. Vanek, O. A. Coso, J. S. Gutkind and S. Spiegel, *Nature*, 1996, **381**, 800.
- 6 A. Morales and J. C. Fernandez-Checa, *Mini-Rev. Med. Chem.*, 2007, **7**, 371.
- 7 B. Ogretmen and Y. A. Hannun, *Nat. Rev. Cancer*, 2004, **4**, 604.
- 8 S. Ponnusamy, M. Meyers-Needham, C. E. Senkal, S. A. Saddoughi, D. Sentelle, S. P. Selvam, A. Salas and B. Ogretmen, *Future Oncol.*, 2010, **6**, 1603.
- 9 (a) B. Segui, N. Andrieu-Abadie, J. P. Jaffrezou, H. Benoist and T. Levade, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 2006, **1758**, 2104; (b) D. E. Modrak, D. V. Gold and D. M. Goldenberg, *Mol. Cancer Ther.*, 2006, **5**, 200; (c) O. Cuvillier, *Anti-Cancer Drugs*, 2007, **18**, 105; (d) A. Huwiler and U. Zangemeister-Wittke, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2007, **63**, 150.
- 10 (a) N. J. Pyne and S. Pyne, *Nat. Rev. Cancer*, 2010, **10**, 489; (b) S. Pyne, R. Bittman and N. J. Pyne, *Cancer Res.*, 2011, **71**, 6576; (c) Y. Edmonds, S. Milstien and S. Spiegel, *Pharmacol. Ther.*, 2011, **132**, 352.
- 11 X. Liu, S. Elojeimy, L. S. Turner, A. E. Mahdy, Y. H. Zeidan, A. Bielawska, J. Bielawski, J. Y. Dong, A. M. El-Zawahry, G. W. Guo, Y. A. Hannun, D. H. Holman, S. Rubinchik, Z. Szulc, T. E. Keane, M. Tavassoli and J. S. Norris, *Front. Biosci.*, 2008, **13**, 2293.
- 12 R. J. Bleicher and M. C. Cabot, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids*, 2002, **1585**, 172.
- 13 E. Lafont, K. Kitatani, T. Okazaki and B. Segui, *Recent Pat. Anti-Cancer Drug Discovery*, 2011, **6**, 324.
- 14 (a) R. A. Claus, M. J. Dorer, A. C. Bunck and H. P. Deigner, *Curr. Med. Chem.*, 2009, **16**, 1978; (b) B. X. Wu, C. J. Clarke and Y. A. Hannun, *NeuroMol. Med.*, 2010, **12**, 320; (c) Y. H. Zeidan and Y. A. Hannun, *Curr. Mol. Med.*, 2010, **10**, 454.
- 15 Y. J. Sigal, M. I. McDermott and A. J. Morris, *Biochem. J.*, 2005, **387**, 281.
- 16 (a) Y. Salma, E. Lafont, N. Therville, S. Carpentier, M. J. Bonnafé, T. Levade, Y. Génisson and N. Andrieu-Abadie, *Biochem. Pharmacol.*, 2009, **78**, 477; (b) Y. Salma, S. Ballereau, C. Maaliki, S. Ladeira, N. Andrieu-Abadie and Y. Génisson, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 3227.
- 17 A. H. Futerman and H. Riezman, *Trends Cell Biol.*, 2005, **15**, 312.

- 18 (a) K. Hanada, K. Kumagai, S. Yasuda, Y. Miura, M. Kawano, M. Fukasawa and M. Nishijima, *Nature*, 2003, **426**, 803; (b) K. Kumagai, S. Yasuda, K. Okemoto, M. Nishijima, S. Kobayashi and K. Hanada, *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 6488, for selected recent reviews, see: (c) K. Hanada, K. Kumagai, N. Tomishige and M. Kawano, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids*, 2007, **1771**, 644; (d) K. Hanada, K. Kumagai, N. Tomishige and T. Yamaji, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids*, 2009, **1791**, 684; (e) K. Hanada, *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.*, 2010, **86**, 426.
- 19 C. Swanton, M. Marani, O. Pardo, P. H. Warne, G. Kelly, E. Sahai, F. Elustondo, J. Chang, J. Temple, A. A. Ahmed, J. D. Brenton, J. Downward and B. Nicke, *Cancer Cell*, 2007, **11**, 498.
- 20 L. Scheffer, P. R. Raghavendra, J. J. Ma and J. K. Acharya, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, 2011, **11**, 904.
- 21 F. Hullin-Matsuda, N. Tomishige, S. Sakai, R. Ishitsuka, K. Ishii, A. Makino, P. Greimel, M. Abe, E. L. Laviad, M. Lagarde, H. Vidal, T. Saito, H. Osada, K. Hanada, A. H. Futerman and T. Kobayashi, *J. Biol. Chem.*, 2012, **287**, 24397.
- 22 (a) M. Ueno, H. Kitagawa, H. Ishitani, S. Yasuda, K. Hanada and S. Kobayashi, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 7863; (b) S. Yasuda, H. Kitagawa, M. Ueno, H. Ishitani, M. Fukasawa, M. Nishijima, S. Kobayashi and K. Hanada, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 43994.
- 23 P. Nussbaumer, *ChemMedChem*, 2008, **3**, 543.
- 24 J. A. M. Rasmussen and A. Hermetter, *Prog. Lipid Res.*, 2008, **47**, 436.
- 25 J. Tuuf, M. A. Kjellberg, J. G. Molotkovsly, K. Hanada and P. Mattjus, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 2011, **1808**, 229.
- 26 (a) M. Fukasawa, M. Nishijima and K. Hanada, *J. Cell Biol.*, 1999, **144**, 673; (b) A. Charruyer, S. M. Bell, M. Kawano, S. Douangpanya, T. Y. Yen, B. A. Macher, K. Kumagai, K. Hanada, W. M. Holleran and Y. Uchida, *J. Biol. Chem.*, 2008, **283**, 16682.
- 27 (a) Regarding cell-based assays, see: ref. 26a; (b) Concerning cell-free experiments, see: ref. 18b.
- 28 Regarding cell-based assays, see: ref. 21.
- 29 (a) T. Yamamoto, H. Hasegawa, T. Hakogi and S. Katsumura, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 5569; (b) T. Yamamoto, H. Hasegawa, S. Ishii, S. Kaji, T. Masuyama, S. Harada and S. Katsumura, *Tetrahedron*, 2008, **64**, 11647.
- 30 (a) P. Nussbaumer, P. Ettmayer, C. Peters, D. Rosenbeiger and K. Hogenauer, *Chem. Commun.*, 2005, 5086; (b) C. Peters, A. Billich, M. Ghobrial, K. Hogenauer, T. Ullrich and P. Nussbaumer, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 1842. During the course of this work an application of this approach to probe ceramidase activity was published: (c) K. P. Bhabak, D. Proksch, S. Redmer and C. Arenz, *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, **20**, 6154.
- 31 For an elegant approach to test the ceramidase activity using a doubly labelled ceramide probe, see: (a) W. F. Nieuwenhuizen, S. van Leeuwen, F. Gotz and M. R. Egmond, *Chem. Phys. Lipids*, 2002, **114**, 181.
- 32 For a recent example regarding ceramide-1-phosphate, see: (a) T. Makiyama, N. Nagasaka, Y. Houjo, E. Yamaura, H. Nakamura, Y. Koide, A. Nishida and T. Murayama, *Biochem. Pharmacol.*, 2010, **80**, 1396.
- 33 (a) N. Kudo, K. Kumagai, N. Tomishige, T. Yamaji, S. Wakatsuki, M. Nishijima, K. Hanada and R. Kato, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, **105**, 488; (b) N. Kudo, K. Kumagai, R. Matsubara, S. Kobayashi, K. Hanada, S. Wakatsuki and R. Kato, *J. Mol. Biol.*, 2010, **396**, 245.
- 34 K. Kumagai, M. Kawano, F. Shinkai-Ouchi, M. Nishijima and K. Hanada, *J. Biol. Chem.*, 2007, **282**, 17758.
- 35 M. Kawano, K. Kumagai, M. Nishijima and K. Hanada, *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 30279.
- 36 For a definition of the notion of docking template, see: <http://www.molegro.com>.
- 37 (a) R. Thomsen and M. H. Christensen, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 3315; (b) O. Korb, T. Stutzle and T. E. Exner, *J. Chem. Inf. Model.*, 2009, **49**, 84.
- 38 (a) T. Hakogi, T. Shigenari, S. Katsumura, T. Sano, T. Kohno and Y. Igarashi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**, 661; (b) P. Ettmayer, A. Billich, T. Baumruker, D. Mechtcheriakova, H. Schmid and P. Nussbaumer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, **14**, 1555.
- 39 E. D. Hostetler, S. Fallis, T. J. McCarthy, M. J. Welch and J. A. Katzenellenbogen, *J. Org. Chem.*, 1998, **63**, 1348.
- 40 X. Ariza, F. Urpi and J. Vilarrasa, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **40**, 7515.
- 41 For the use of Plasmon Surface Resonance in the real-time monitoring of ceramide extraction by CERT, see: (a) T. Sugiki, H. Takahashi, M. Nagasu, K. Hanada and I. Shimada, *Anal. Biochem.*, 2010, **399**, 162.
- 42 (a) C. S. Rao, X. Lin, H. M. Pike, J. G. Molotkovsky and R. E. Brown, *Biochemistry*, 2004, **43**, 13805; (b) G. Schwarzmann, M. Wendeler and K. Sandhoff, *Glycobiology*, 2005, **15**, 1302.
- 43 (a) A. Duris, T. Wiesenganger, D. Moravcikova, P. Baran, J. Kozisek, A. Daich and D. Berkes, *Org. Lett.*, 2011, **13**, 1642; (b) M. Ueno, Y.-Y. Huang, A. Yamano and S. Kobayashi, *Org. Lett.*, 2013, **15**, 2869.
- 44 D. D. Perrin and W. L. Amarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, 3rd Ed., Pergamon Press, 1998.
- 45 E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng and T. E. Ferrin, *J. Comput. Chem.*, 2004, **25**, 1605.
- 46 E. C. Meng, E. F. Pettersen, G. S. Couch, C. C. Huang and T. E. Ferrin, *BMC Bioinformatics*, 2006, **7**, 339.
- 47 J. A. Medin, T. Takenaka, S. Carpentier, V. Garcia, J. P. Basile, B. Segui, N. Andrieu-Abadie, N. Auge, R. Salvayre and T. Levade, *Hum. Gene Ther.*, 1999, **10**, 1321.

3) Conclusion intermédiaire

Ces travaux ont permis de développer une nouvelle sonde C16-céramide-NBD qui présente le même comportement que le céramide naturel dans la cellule et une bonne reconnaissance par la protéine. Cette sonde est un outil utile dans l'évaluation *ex vivo* et *in vitro* de la reconnaissance de ligands de la protéine CERT. En effet, elle offre une gamme d'utilisation, validée ou potentielle :

- Comme sonde fluorescente de céramide remplaçant le C5-DMB- Cer et le C6-NBD-Cer dans le test de liaison spécifique *in vitro*.
- Du fait de ses propriétés physicochimiques plus proche du Cer naturel, limitant ainsi sa diffusion spontanée intermembranaires, elle pourrait être utilisée :
 - comme sonde fluorescente de céramide remplaçant le C5-DMB-Cer et le C6-NBD-Cer dans les essais *ex vivo* de suivi de redistribution du céramide fluorescent, en présence ou non de compétiteur.
 - potentiellement, en tant que sonde fluorescente de céramide dans l'essai *in vitro* de transport intervésiculaire. Elle substituerait alors le céramide radiomarqué dans la vésicule phospholipidique donneuse. L'évaluation de la quantité de céramide transféré, en présence ou non de compétiteur, se ferait ainsi par mesure de l'intensité de fluorescence entre les vésicules acceptrices (surnageant) et les vésicules donneuses (résidu).

Ces travaux d'optimisation du test de liaison spécifique ont permis d'accéder à un test *in vitro* de reconnaissance d'un ligand par le domaine START. Ceci a rendu possible la corrélation entre les résultats d'interactions *in vitro* des ligands avec START et les résultats *in silico*, dans le but de valider la méthode d'arrimage développée.

III. Méthode d'identification de nouveaux ligands

Suite au développement du test *in vitro* de liaison spécifique au domaine START, les scores calculés pour chaque ligand par la méthode d'arrimage précédemment développée ont pu être corrélés aux valeurs expérimentales de liaison *in vitro*. Un travail d'optimisation de ces scores a ensuite été réalisé dans le but d'obtenir une méthode prédictive d'identification *in silico* de ligands du domaine START.

1) Corrélation *in silico* & *in vitro*

Dans un premier temps, nous avons sélectionné un ensemble de composés pour lesquels des données relatives à leur interaction avec la protéine CERT était connue dans la littérature (qu'il s'agisse d'un transfert intermembranaire²⁹ ou de structures co-cristallines^{1, 2}). Cet ensemble a été soumis au test de liaison spécifique développée au laboratoire. Nous avons ajouté à cette sélection des composés de structure proche du D-erythro-céramide, tels que le D-ribo-phytocéramide (PhytoCer), le (S)-didécanoylglycérol (DDR), la D-erythro-sphingosine (Sph), le glucosylcéramide (GlcCer) et la sphingomyéline (SM). Les deux stéréoisomères du HPA-12, le (1R,3R)-HPA-12, initialement reporté comme le stéréoisomère le plus actif et co-cristallisé avec START,^{23, 33} et le (1R,3S)-HPA-12, structure révisée du stéréoisomère le plus actif,³⁴⁻³⁶ ont été ajoutés à cette sélection. Le cholestérol, lipide non reconnu par CERT et structurellement éloigné du céramide, a été choisi dans l'étude comme contrôle négatif.

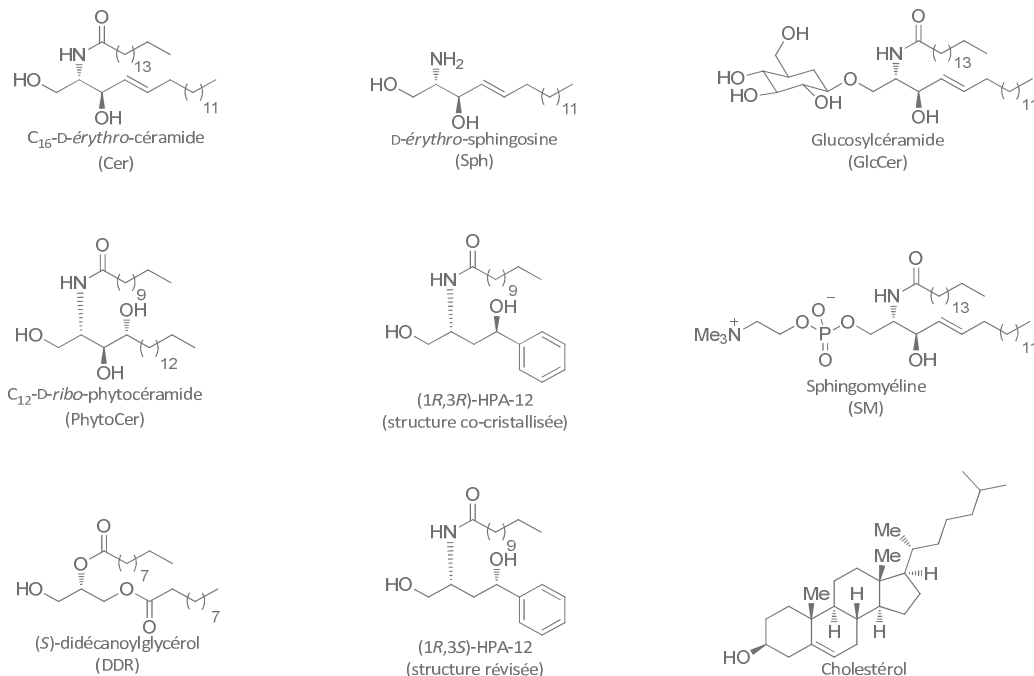


Figure 23 – Structures des composés évalués *in vitro* et *in silico*

Dans ce test de liaison spécifique, le compétiteur est pré-incubé avec le domaine START étiqueté avec l'histidine, puis la sonde fluorescente est ajoutée. Après incubation, le complexe est fixé sur la résine d'affinité métallique, permettant le lavage de la sonde non liée, suivie de l'élution du complexe START-sonde fluorescente. Le rapport entre l'intensité de fluorescence de la « fraction

liée » et de l'ensemble des fractions de lavage, dites « fractions non liées », permet de quantifier la liaison de la sonde au domaine START. Le déplacement de la sonde par un compétiteur entraîne une diminution de l'intensité de fluorescence de la « fraction liée » par rapport à une expérience sans compétiteur. L'ensemble des résultats représentant le pourcentage de liaison de la sonde par rapport à une expérience témoin sans compétiteur, est reporté dans la Figure 24.

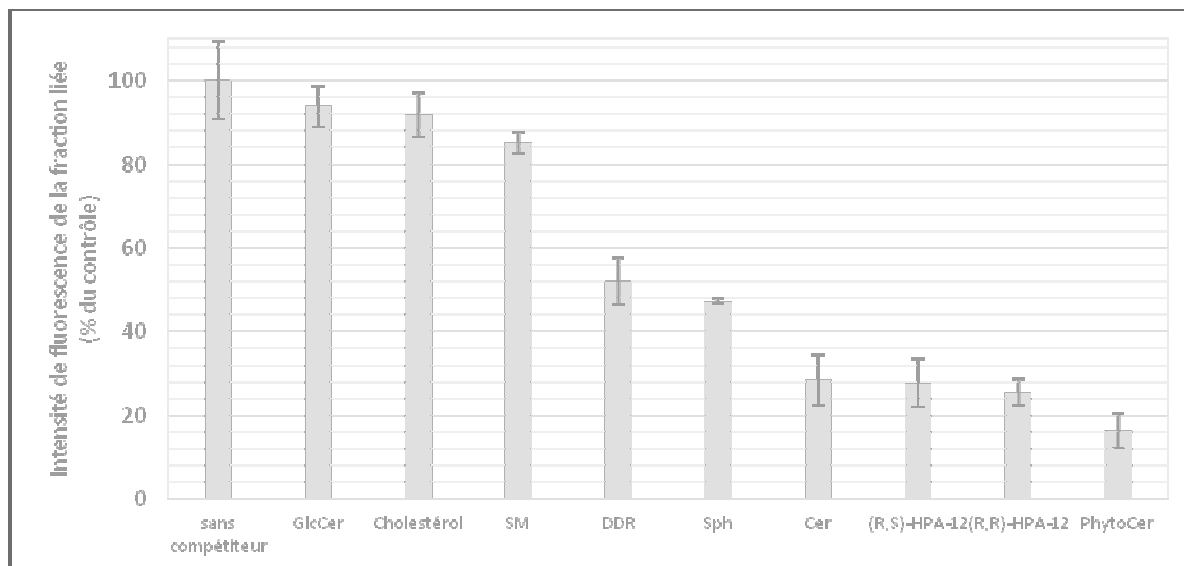


Figure 24 – Test de liaison de la sonde C16-NBD-céramide en présence de compétiteurs

Parmi ces composés, on distingue trois groupes de ligands. Le premier groupe, composé du GlcCer, du cholestérol et de la SM, ne présente pas de baisse significative de l'intensité de fluorescence de la fraction liée en comparaison au contrôle. Cette absence de reconnaissance par le domaine START est en accord avec la littérature. En effet, la structure polycyclique du cholestérol est très éloignée de celle du céramide, et le résidu en position O-1 du GlcCer et de la SM est particulièrement volumineux. Ce comportement est aussi cohérent avec l'absence d'extraction et de transfert de ces lipides dans l'essai de transfert intervésiculaire de Hanada.²⁹ Le DDR et la Sph constituent le deuxième groupe de ligands. Leur compétition avec la sonde entraîne une diminution de l'intensité de fluorescence d'environ 50%, indiquant une reconnaissance modérée par START en accord avec la proximité structurale de ces composés avec le céramide. Bien que le DDR soit très faiblement transporté par CERT (5 à 10% par rapport au transfert du céramide) et que le transfert de la Sph soit inexistant dans l'essai de transfert intervésiculaire,²⁹ l'existence d'une structure RX du domaine START co-cristallisé avec le DDR confirme cette reconnaissance. Le test de compétition évalue uniquement la liaison du composé avec le domaine START, alors que le test d'extraction et transfert intermembranaire prend en compte l'ensemble des fonctions de la protéine CERT, phénomène complexe faisant intervenir successivement plusieurs interactions. Cette différence peut expliquer la disparité observée entre ces deux tests. Par ailleurs, la liaison observée avec la Sph suggère, de façon importante pour la suite des travaux, que l'atome d'azote protonable d'une amine est apte à mimer l'atome d'azote de l'amide du Cer. Enfin, le dernier groupe de ligands, composé du céramide, des HPAs-12 et du PhytoCer, présente une forte compétition avec la sonde entraînant une diminution de l'intensité de fluorescence de 75 à 80%. Cette forte reconnaissance du céramide, ligand naturel de la protéine, et des HPAs, antagoniste de CERT, est en accord avec la littérature et les résultats de transfert intervésiculaire de Hanada.²⁹ Un parallèle entre le DDR et le PhytoCer peut être établi, ce

dernier étant fortement reconnu par START dans l'expérience de compétition tout en étant moyennement transféré dans le test de transport intermembranaire.²⁹

Après évaluation des interactions de ces composés avec le domaine START, la méthode d'arrimage moléculaire développée et décrite précédemment a été appliquée à cette série de composés. L'ensemble des scores pour les poses retenues pour chaque ligand ainsi que le pourcentage de liaison de la sonde par rapport au contrôle sont reportés dans le Tableau 5, permettant de mettre en regard les résultats *in silico* et *in vitro*.

Tableau 5 – Données *in silico* et *in vitro* des ligands de START

Nom	MolDock	Rerank	Liaison de la sonde (% du contrôle)
[10]Glucosylcéramide	-234,52	-168,16	93,8±4,97
[02]Cholestérol	-131,95	-107,37	91,9±5,36
[03]Sphingomyéline	-250,57	-185,31	85,1±2,57
[21]DDR	-161,94	-121,59	52,1±5,63
[06]Sphingosine	-124,58	-96,14	47,3±0,68
[01] C16-D-erythro-céramide	-232,19	-168,27	28,4±6,04
[30]R S HPA 12	-149,68	-115,42	27,7±5,71
[02]R R HPA 12	-153,89	-121,60	25,5±3,16
[36]D-ribo-phytocéramide	-192,87	-146,19	16,3±4,20

Pour chaque compétiteur, plus les valeurs des scores *Moldock* et *Rerank* sont faibles, meilleure est l'interaction *in silico*. D'autre part, plus la liaison de la sonde céramide est faible, meilleure est l'interaction *in vitro*. Les interactions les plus fortes sont reportées en vert dans le tableau, les interactions moyennes en orange et les interactions faibles en rouge. A l'exception du cholestérol et du céramide, il n'y a pas de corrélation entre les résultats *in silico* et *in vitro*. Les scores *Moldock* et *Rerank* ne suffisent pas à eux seuls pour évaluer convenablement l'interaction d'un ligand avec le domaine START. D'autres descripteurs doivent être pris en compte dans la méthode.

2) Limites et optimisation de la méthode

L'analyse des scores *Moldock* et *Rerank* obtenus pour cette série de composés indique que la SM, le GlcCer et le céramide sont les mieux reconnus par START ; puis par ordre de reconnaissance décroissant, le PhytoCer, le DDR, les HPAs, le cholestérol puis la Sph. Cette sélection des ligands peut être biaisée dans le cas des ligands à fort poids moléculaire dû à une contribution non significative des interactions lipophiles associées aux longues chaînes aliphatiques.³⁷ Ainsi, afin de minimiser la contribution des poids moléculaires dans l'évaluation de l'énergie des complexes ligand-protéine, deux descripteurs normalisés : *LE1* et *LE3*,^{16, 37} sont considérés dans l'étude de corrélation *in silico* et *in vitro*. Les *LE1* et *LE3*, pour *Ligand Efficiency*, correspondent respectivement aux scores *Moldock* et *Rerank* divisés par le nombre d'atomes lourds tels que C, N et O (*Heavy atoms* ou *HA*). Les valeurs de ces descripteurs sont reportées dans le Tableau 6. Le même code couleur est utilisé dans ce tableau : meilleures valeurs en vertes, moyennes en orange et faibles en rouge.

L'analyse du Tableau 6 indique une forte corrélation entre les scores *Moldock* et *Rerank* et le nombre d'atomes lourds. Les meilleurs scores correspondent aux ligands ayant le nombre d'atomes lourds le plus important. Cela confirme ainsi que le poids moléculaire des ligands doit être considéré pour ne pas introduire un biais dans l'évaluation des interactions ligand-protéine.

Tableau 6 – Données *in silico* pondérées et données *in vitro* des ligands de START

Nom	MolDock	Rerank	Heavy atoms	LE1	LE3	Liaison de la sonde (% du contrôle)
[10]Glucosylcéramide	-234,52	-168,16	49	-4,79	-3,43	93,8±4,97
[02]Cholestérol	-131,95	-107,37	28	-4,71	-3,83	91,9±5,36
[03]Sphingomyéline	-250,57	-185,31	48	-5,22	-3,86	85,1±2,57
[21]DDR	-161,94	-121,59	28	-5,78	-4,34	52,1±5,63
[06]Sphingosine	-124,58	-96,14	21	-5,93	-4,58	47,3±0,68
[01] C16-D-erythro-céramide	-232,19	-168,27	38	-6,11	-4,43	28,4±6,04
[30]R S HPA 12	-149,68	-115,42	26	-5,76	-4,44	27,7±5,71
[02]R R HPA 12	-153,89	-121,6	26	-5,92	-4,68	25,5±3,16
[36]D-ribo-phytocéramide	-192,87	-146,19	31	-6,22	-4,72	16,3±4,20

Lorsque les *LE1* et *LE3* sont comparés à la liaison de la sonde, on observe une tendance à la corrélation entre les résultats *in silico* et *in vitro*. Les composés n'ayant pas ou très peu d'interaction avec START sont identifiés avec les plus mauvaises valeurs de *LE1* et *LE3* (scores en rouge dans le Tableau 6). A l'inverse, les composés ayant une interaction modérée ou forte avec START présentent les meilleurs valeurs de *LE1* et *LE3* (scores en orange ou vert dans le Tableau 6).

Cette corrélation est visualisée sur les graphiques A et B de la Figure 25 représentant le *LE1* et le *LE3* respectivement en fonction de la liaison résiduelle de la sonde après compétition. Les composés situés dans la zone en bas à gauche de ces graphiques seront alors reconnus par START et ceux situés en haut à droite ne présenteront pas d'interaction avec la protéine. Le graphique C de la Figure 25, représentant le *LE3* en fonction du *LE1*, montre que ces deux descripteurs permettent de discriminer les composés reconnus (représentés en vert, en bas à gauche du graphique), des composés non reconnus (représentés en rouge, en haut à droite du graphique).

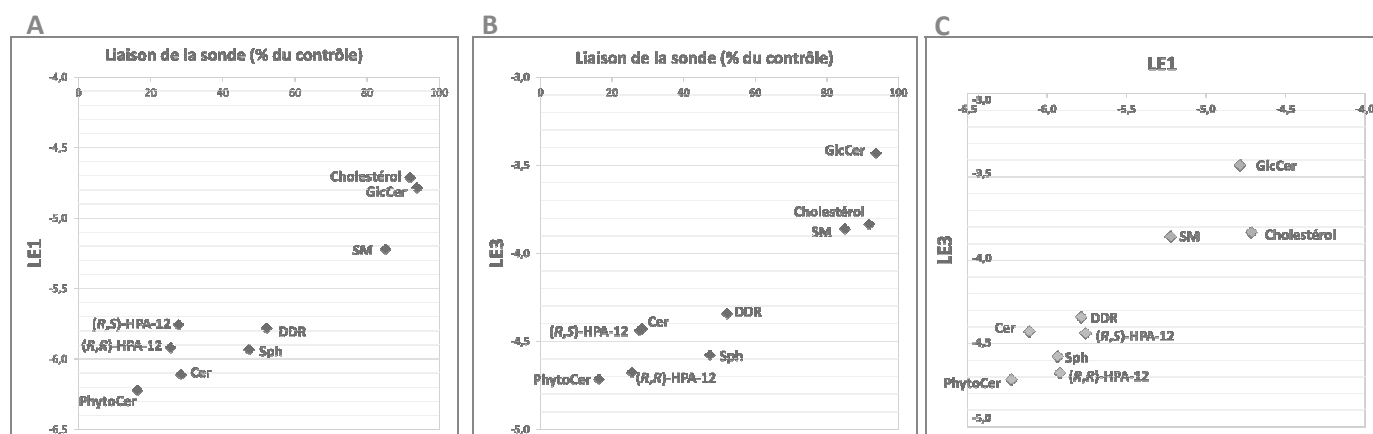


Figure 25 – Corrélation du LE1, LE3 et de la liaison de la sonde

Les descripteurs *LE1* et *LE3* sont ainsi capables d'identifier les ligands reconnus par START et ceux qui n'auront aucune interaction. En revanche, ces descripteurs ne peuvent pas différencier une interaction forte d'une interaction modérée. D'autres facteurs, tels que l'analyse du réseau de

liaisons hydrogènes entre la partie polaire du ligand et START et l'analyse des interactions hydrophobes entre les chaînes lipidiques du ligand et START, doivent être pris en considération pour évaluer plus finement l'interaction d'un ligand avec la protéine.

3) Validation de la méthode

Afin de confirmer la corrélation *in silico/in vitro* observée sur la première série de composés, une nouvelle étude de corrélation *in silico* et *in vitro* a été effectuée sur une deuxième série de composés, disponibles au laboratoire ou facilement accessibles, le nombre de composés étudiés devenant alors suffisant pour valider la méthode.

La sélection des composés a été réalisée selon trois critères prenant notamment en compte les éléments de reconnaissance recueillis précédemment :

- Structures amphiphiles pouvant développer des interactions avec la zone polaire et la zone hydrophobe de la cavité du domaine START (par analogie avec le Cer et l'HPA-12).
- Structures contenant une amine et des groupements hydroxyles (par analogie avec la Sph) pouvant générer des interactions fortes avec la région hydrophile de la poche de liaison.
- Structures cycliques relativement rigides présentant un nombre restreint de conformations potentiellement actives, selon une stratégie classique de rigidification structurale.

Ainsi différents iminosucres (AR400, AR402 et CN015704V), un analogue du PhytoCer (SFA40) et des analogues contraints des HPAs (ToISC-10 et DM744) ont été sélectionnés. En plus de répondre aux critères de sélection structurale, la jaspine B, composé cytotoxique d'origine naturelle, est connue pour inhiber la synthèse *de novo* de la SM (cf. Chapitre III). La jaspine B et des analogues (AR285, *ent*-jaspine B et SB140) ont alors été ajoutés à cette sélection.

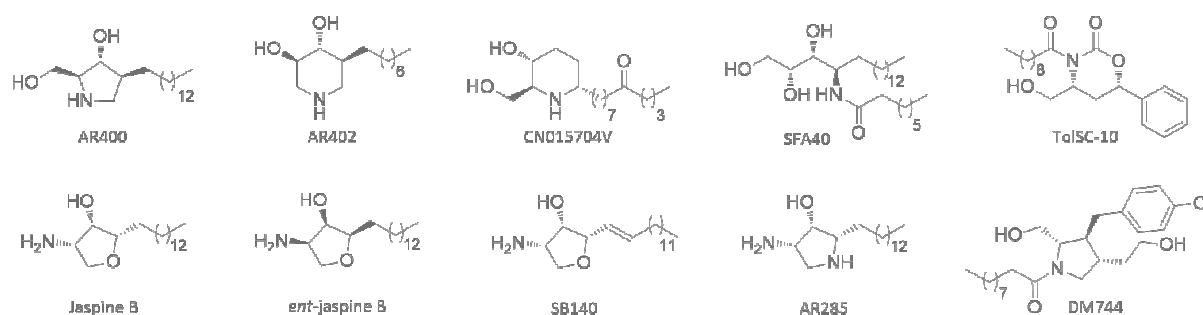


Figure 26 – Structures de la deuxième série de composés évalués *in silico* et *in vitro*

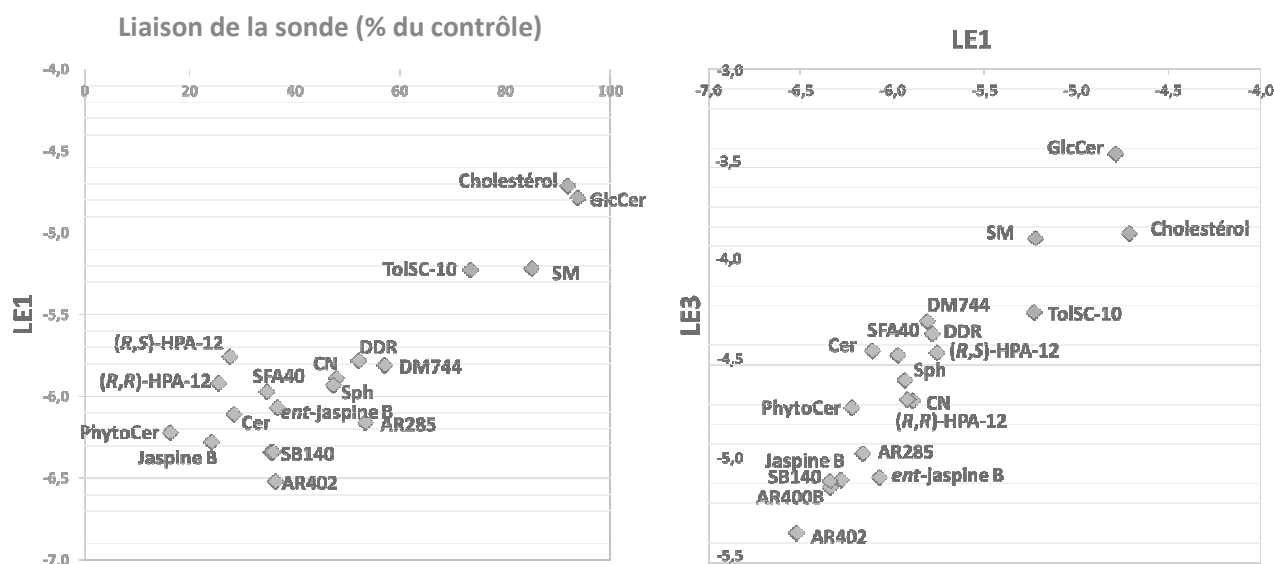
Les résultats des évaluations *in silico* et *in vitro* de cette série de composés sont reportés dans le Tableau 7.

Tableau 7 – Données *in silico* pondérées et données *in vitro* de la deuxième série de composés

Nom	MolDock	Rerank	Heavy atoms	LE1	LE3	Liaison de la sonde (% du contrôle)
[07]JaspineB	-132,05	-106,73	21	-6,28	-5,08	24,2±3,25
[06]ent-jaspineB	-127,63	-106,65	21	-6,07	-5,07	36,7±0,33
[07]AR400B	-139,65	-112,77	22	-6,34	-5,12	35,5±6,37
[38]AR285	-154,18	-123,99	25	-6,16	-4,95	53,4±6,20
[19]AR402	-104,46	-85,69	16	-6,52	-5,35	36,3±8,48
[34]SFA40	-185,2	-138,21	31	-5,97	-4,45	34,7±5,63
[19]DM744	-185,99	-137,21	32	-5,81	-4,28	57,1±14,0
[00]ToISC-10	-141,22	-114,32	27	-5,23	-4,23	73,4±4,51
[17]CN015704V	-129,7	-103,1	22	-5,89	-4,68	47,9±10,0
[03]SB140	-133,27	-107,05	21	-6,34	-5,09	35,8±6,07

Cette série de composés présente la même tendance que la première série. Les composés n'entrant pas en compétition avec la sonde fluorescente céramide présentent de mauvais scores *LE1* et *LE3* (en rouge). Les composés ayant une interaction *in vitro* forte ou modérée avec START présentent les meilleurs scores *LE1* et *LE3* (orange ou vert).

Comme pour la première série, les descripteurs *LE1* et *LE3* permettent de discriminer les composés ne présentant aucune interaction avec START de ceux ayant une interaction forte ou modérée (cf. Figure 27).

Figure 27 – Corrélation du *LE1* et de la liaison de la sonde, ainsi que du *LE1* et *LE3*, sur l'ensemble des composés

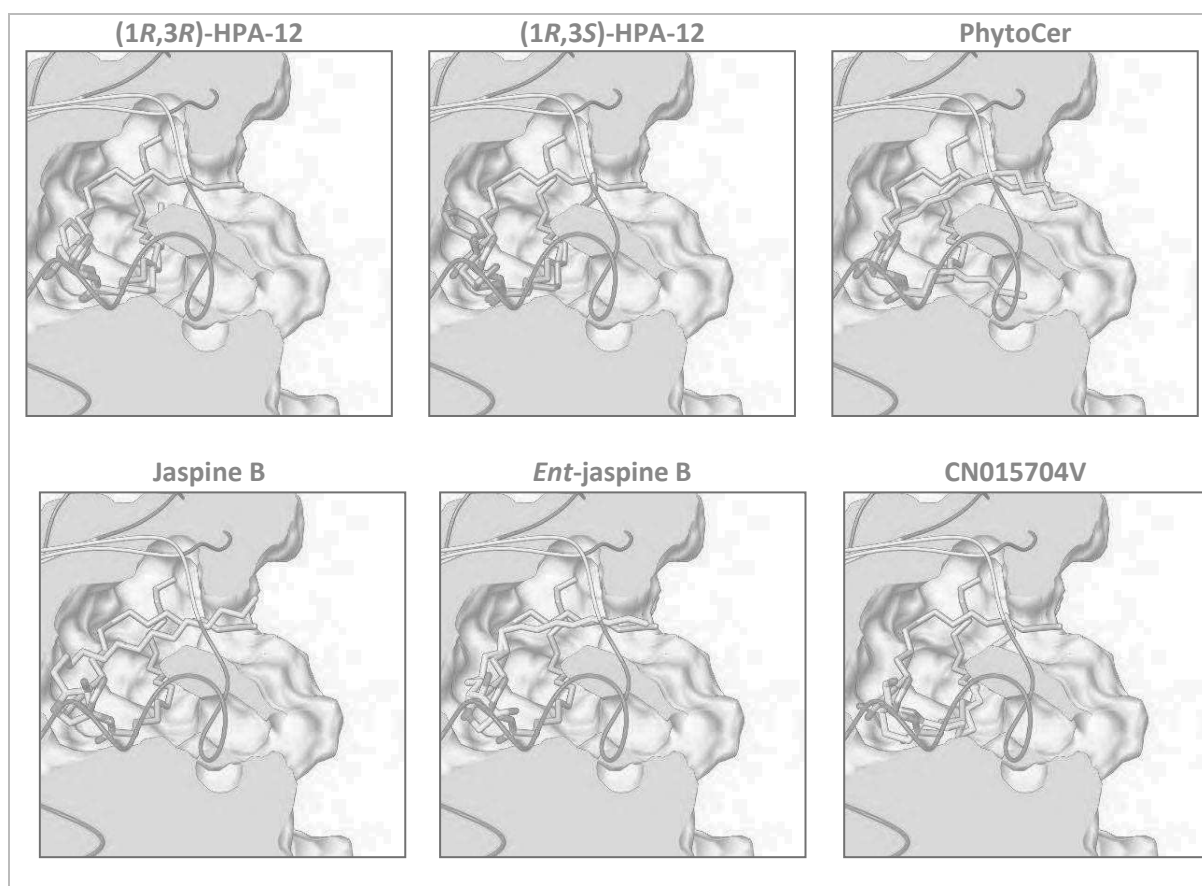
Ainsi, cette méthode *in silico* fait émerger deux catégories de composés : ligands de START ou non ligands. Les scores *LE1* et *LE3* sont donc un premier filtre exclusif mais non prédictif de l'interaction entre le ligand et la protéine.

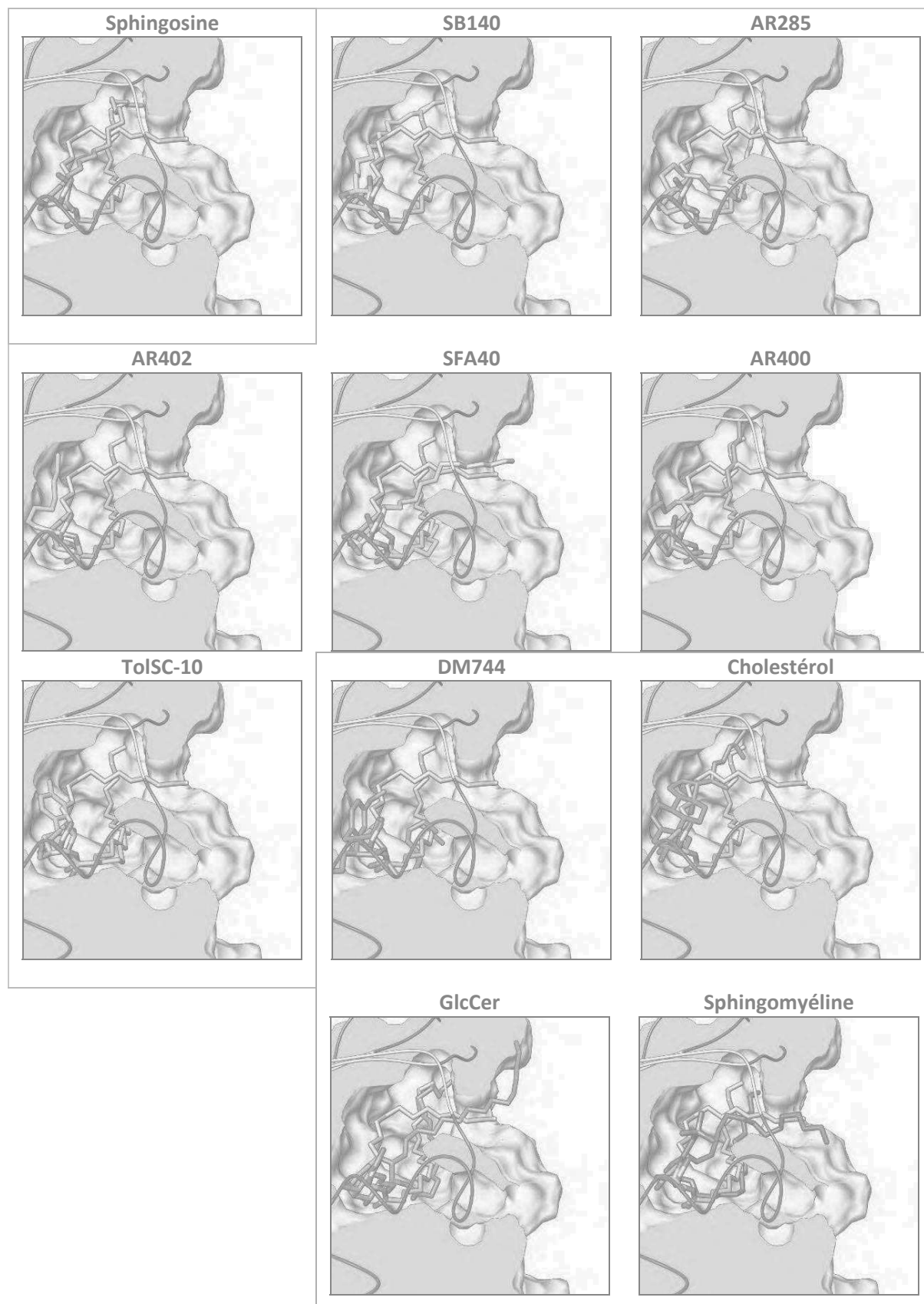
L'analyse visuelle des poses retenues et l'analyse de leur réseau d'interactions avec START permettent une deuxième sélection des composés reconnus par la protéine (cf. Tableau 8). L'analyse

visuelle vise à contrôler la superposition de la partie polaire du ligand avec celle du céramide co-cristallisé (superposition des fonctions amide ou amine des ligands avec la fonction amide du céramide, superposition des groupements hydroxyles) et l'orientation des chaînes lipidiques (absence de gêne stérique, même orientation que les chaînes des céramides et HPAs co-cristallisés).

Cette analyse permet d'identifier trois classes de composés sur l'ensemble des séries. La première classe constitue les bons ligands de START (représentés en vert dans le Tableau 8). Elle est composée des HPAs-12, du PhytoCer, de la Jaspine B et son énantiomère, du composé CN015704V et de la Sph. La deuxième classe, incluant les analogues de la jaspine SB140 et AR285, les iminosucres AR400 et AR402, l'analogue du phytocéramide SFA40 et l'analogue contraint de l'HPA TolSC-10, constitue les ligands ayant une interaction modérée avec START (représentés en orange dans le Tableau 8). La dernière classe, composée de l'analogue contraint de l'HPA DM744, du cholestérol, du GlcCer et de la SM, représente les molécules n'ayant pas ou très peu d'interactions avec START (en rouge dans le Tableau 8).

Tableau 8 – Poses calculées des ligands de START superposées avec la pose cristallographique du C16-Cer (en gris)





En combinant les résultats du premier filtre avec cette deuxième sélection, le groupe de composés ligands de START est réduit aux HPAs-12, PhytoCer, jaspine B et *ent*-jaspine B, en accord avec les résultats du test de liaison FLINT *in vitro*. Cette méthode *in silico*, basée sur l'analyse des scores *LE1* et *LE3* puis l'analyse des poses calculées, constitue un filtre efficace, bien que perfectible, dans l'identification qualitative d'antagonistes potentiels de la protéine CERT. En effet, des indices, autres que *Heavy atoms*, peuvent être pris en considération pour normaliser les scores issus du docking et améliorer la corrélation entre les valeurs expérimentales et calculées.³⁸ Des critères liés à la perméabilité du composé (coefficient de partition *logP*) ou à sa topologie (indice de Wiener *W*) pourront ainsi être introduits ultérieurement dans la méthode. Néanmoins, la méthode précédemment développée et validée sera utilisée pour le criblage *in silico* et la conception rationnelle de ligands du domaine START. L'article suivant reprend les principaux résultats pour la validation de la méthode.³⁹

DOI: 10.1002/cbic.201402366

Identification of Novel CERT Ligands as Potential Ceramide Trafficking Inhibitors

Cécile Santos,^[a] Frédéric Rogriguez,^[a] Virginie Garcia,^[b] Daniela Moravčíková,^[c]
Dušan Berkeš,^[c] Adam Daich,^[d] Thierry Levade,^[b] Cécile Baudoin-Dehoux,^[a]
Stéphanie Ballereau,^{*[a]} and Yves Génisson^{*[a]}

A highly compartmentalized enzymatic network regulates the pro-apoptotic and proliferative effects of sphingolipids. Over-conversion of ceramide (Cer) correlates with insensitivity to apoptosis signaling (in response to chemotherapy) and to drug resistance of cancer cells. De novo sphingomyelin biosynthesis relies on non-vesicular ceramide trafficking by the CERT (CERamide Transfer) protein. Therefore, blocking CERT transfer, thus leading to increased intracellular ceramide availability, represents a potential anticancer strategy. Our study is based on the implementation of an in vitro binding assay, supported by in silico molecular docking. It constitutes the first attempt to explore at the molecular level for the identification of novel CERT ligands. This approach is the first step toward in silico design and optimization of CERT inhibitor candidates, potentially relevant as innovative ceramide-transfer-targeting therapeutic agents.

Sphingolipids (SLs), ubiquitous components of eukaryotic cells, are involved in both membrane structure and cell signaling. A highly compartmentalized enzymatic network regulates the pro-apoptotic (ceramide, sphingosine) and proliferative (glucosylceramide, sphingosine-1-phosphate) effects of SLs.^[1] Cancer cells exhibit an unbalanced equilibrium between the pools of tumor-promoting and -suppressing SLs in favor of the proliferative compounds.^[2] This can arise from reduced intracellular pro-apoptotic ceramide (Cer) as a consequence of enhanced degradation or increased transformation into glucosylceramide (GlcCer) or sphingomyelin (SM).^[3] Over-conversion of Cer is as-

sociated with insensitivity to apoptosis signaling induced by chemotherapy and consequent drug resistance of cancer cells.^[4] Unlike for the inhibition of Cer glucosylation,^[5] controlling the Cer-SM pathway to restore significant intracellular Cer rate has only recently been explored.^[6]

In de novo SL biosynthesis, Cer is generated in the endoplasmic reticulum (ER) and transferred to the Golgi apparatus to be functionalized at the primary hydroxyl (Scheme 1).^[7] De novo SM biosynthesis specifically relies on non-vesicular ceramide trafficking by the ceramide transfer protein CERT (CERamide Transfer).^[8] Inactivation and caspase cleavage of this protein was shown to be a cellular response to pro-apoptotic stress.^[9] CERT expression is higher in drug-resistant cell lines,^[10] and genetic or pharmacological CERT inhibition resulted in resensitization of cancer cells to chemotherapeutic agents like taxanes.^[11] Blocking CERT-mediated inter-organelle transfer led to increased intracellular ceramide availability, and thus represents a potential anticancer strategy.^[12]

CERT is a cytosolic 68 kDa multidomain protein.^[13] The N-terminal Pleckstrin homology (PH) domain (~120 residues) is responsible for CERT localization to the Golgi apparatus.^[14] The central region (~250 residues) contains a serine-rich (SR) motif and the FFAT (diphenylalanine (FF) in an acidic tract) motif that targets the ER.^[15] The C-terminal START (STERoidogenic ACute Regulatory protein-related lipid Transfer) domain (~210 residues) has a long amphiphilic cavity specific for *D*-erythro-ceramide; while the latter is per se responsible for the Cer binding, the three regions are necessary for the transport activity of the protein.^[16]

A single family of CERT inhibitors, HPA, is known.^[17] HPA-12 was identified as a specific inhibitor of ceramide trafficking in 2001, before the report of the CERT-associated non-vesicular ceramide transfer mechanism.^[18] Among the four diastereoisomeric HPAs, only a single pair of enantiomers (1*R**,3*R**; corrected later as 1*R**,3*S**),^[19] was individually evaluated for inhibition of de novo SM production. The most potent HPA stereoisomer, to which the (1*R*,3*R*) stereochemistry was initially assigned,^[20] has been recently revised as the (1*R*,3*S*) stereoisomer.^[21] However, no structure-activity relationship evaluation of individual HPA diastereoisomers has been reported, in particular regarding their distinct molecular mode of interaction with the protein, as previously identified by X-ray crystallography for the (1*R*,3*R*) derivative (vide infra).

Because of the relevance of inhibition of CERT-mediated Cer trafficking to anticancer strategies, development of a practical approach for the design and identification of new CERT ligands

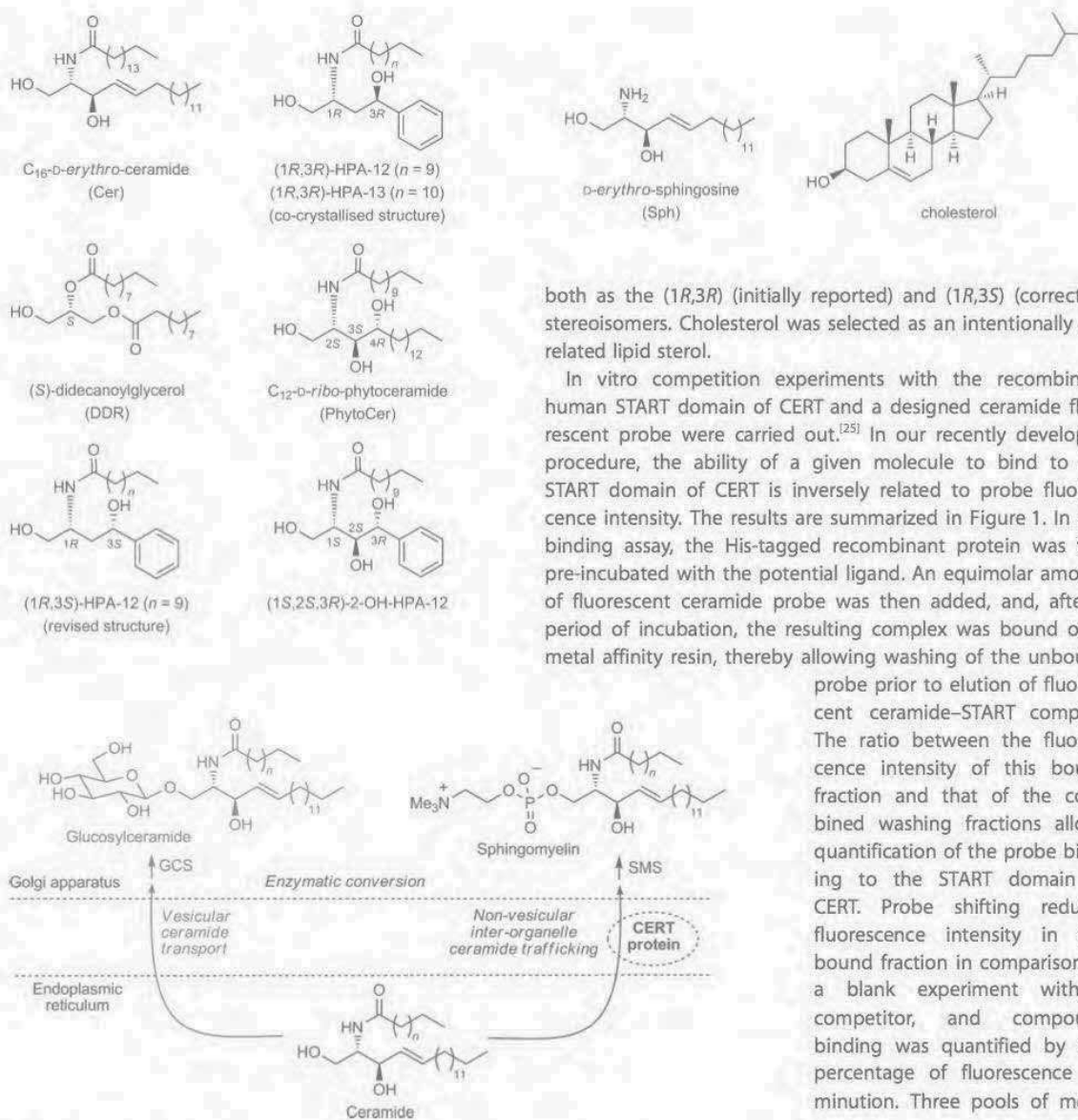
[a] C. Santos, F. Rogriguez, Dr. C. Baudoin-Dehoux, Dr. S. Ballereau, Dr. Y. Génisson
SPCMIB, UMR-CNRS 5068-Université Paul Sabatier-Toulouse III
118, route de Narbonne, F-31062 Toulouse Cedex 9 (France)
E-mail: genisson@chimie.ups-tlse.fr
ballereau@chimie.ups-tlse.fr

[b] V. Garcia, Prof. T. Levade
CRCT, UMR1037 INSERM-Université Paul Sabatier-Toulouse III
CHU Rangueil, BP 84225, Toulouse (France)

[c] D. Moravčíková, Dr. D. Berkeš
Department of Organic Chemistry, Slovak University of Technology
Radlinského 9, 81237 Bratislava (Slovakia)

[d] Prof. A. Daich
URCOM, EA 3221, INC3M CNRS FR-3038
UFR Sciences et Techniques, Université du Havre
25, rue Philippe Lebon, B.P. 540, F-76058 Le Havre Cedex (France)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201402366>.



Scheme 1. Ceramide maturation pathways.

is needed. We describe here our first results in this aim, based on the implementation of an in vitro binding experiment substantiated by in silico molecular docking.

First, we selected a set of Cer-related compounds for which recognition of CERT was reported to occur (or not) on the basis of cell-free (inter)membrane transfer/extraction data^[8a,22] or co-crystallized X-ray structures (vide infra).^[23,24] CERT is known to be highly selective toward D-erythro-ceramides. Close double-chain analogues, such as D-ribo-phytoceramide (PhytoCer) or (S)-didecanoylglycerol (DDR), were included. Other Cer-related derivatives, both the parent single-chain D-erythro-sphingosine (Sph) and O1-functionalized derivatives GlcCer and SM, were also evaluated. HPA-12 was included,

both as the (1R,3R) (initially reported) and (1R,3S) (corrected) stereoisomers. Cholesterol was selected as an intentionally unrelated lipid sterol.

In vitro competition experiments with the recombinant human START domain of CERT and a designed ceramide fluorescent probe were carried out.^[25] In our recently developed procedure, the ability of a given molecule to bind to the START domain of CERT is inversely related to probe fluorescence intensity. The results are summarized in Figure 1. In this binding assay, the His-tagged recombinant protein was first pre-incubated with the potential ligand. An equimolar amount of fluorescent ceramide probe was then added, and, after a period of incubation, the resulting complex was bound on a metal affinity resin, thereby allowing washing of the unbound probe prior to elution of fluorescent ceramide-START complex. The ratio between the fluorescence intensity of this bound fraction and that of the combined washing fractions allows quantification of the probe binding to the START domain of CERT. Probe shifting reduces fluorescence intensity in this bound fraction in comparison to a blank experiment without competitor, and compound binding was quantified by this percentage of fluorescence diminution. Three pools of mole-

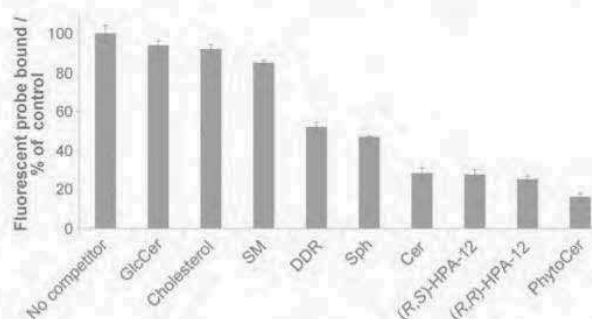


Figure 1. Binding assays of a Cer fluorescent probe to the START domain in the presence of competitors. The bars represent the probe fluorescence as a percentage of the control value (without competitor). Results are means from triplicate experiments.

cules were identified: low (GlcCer, cholesterol, SM), intermediate (Sph, DDR), and strong (HPA-12, Cer, PhytoCer) protein recognition.

Pre-incubation with GlcCer, cholesterol and SM did not lead to any significant decrease in fluorescence, consistent with their structural dissimilarity from *D-erythro*-ceramide. Notably, the absence of recognition for this first pool of lipids is consistent with the presence of the bulky substituent on the primary alcohol, likely to impair protein binding and in agreement with their lack of (inter)membrane extraction/transfer by CERT in a cell-free system.^[8a, 22]

Competition experiments (Supporting Information) with (*S*)-didecanoylglycerol (DDR) and *D-erythro*-sphingosine revealed approximately 50% decrease in fluorescence, thus indicating that these lipids appreciably bind to the START domain. The substantial recognition of DDR and sphingosine by the START domain is consistent with their similarity to *D-erythro*-ceramide. Yet, CERT-mediated lipid extraction or intermembrane transfer activity for various diacylglycerols was very weak (only 5–10% of that of natural ceramide) and nonexistent for sphingosine.^[8a, 22] This discrepancy can be attributed to the fact that whereas competition experiments only evaluate the extent of ligand binding to the START domain, lipid-extraction and intermembrane transfer assays quantify the overall protein function. CERT transfer is indeed a complex multistep process involving several successive interactions, such as protein–membrane, lipid–membrane, and lipid–protein. The data here suggest that its efficiency is not governed solely by protein–lipid interaction. The reported cocrystallized X-ray structure of DDR with the START domain (PDB IDs: 2Z9Z, 2Z9Y),^[23] which indicates of an appreciable degree of molecular recognition, is in line with this analysis.

The natural CERT ligand C_{16} -*D-erythro*-ceramide and both stereoisomeric synthetic inhibitors (1*R*,3*R*)- and (1*R*,3*S*)-HPA-12 gave roughly 75% reductions in fluorescence, thus evidencing strong competition with the fluorescent probe. Even stronger binding to the START domain was observed for the close analogue *D-ribo*-phytoceramide (> 80% decrease in fluorescence). The results obtained for this last pool of ligands deserve comment.

D-Ribo-phytoceramide emerged as the best START domain ligand (Figure 1). As the efficiency of CERT-mediated extraction/transfer of this ceramide has been reported to be less than 50% of that of the natural ligand *D-erythro*-ceramide,^[8a, 22] this situation parallels that of DDR and sphingosine. Notably, *D-ribo*-phytoceramide possesses a stereochemical pattern identical to that of the most active (1*S*,2*S*,3*R*) diastereoisomer of a series of 2-hydroxylated analogues of HPA.^[20]

We then turned our attention to *in silico* docking to gain insights into the mode of interaction between this first set of ligands and the CERT START domain binding pocket.

Crystallographic structures of the START domain in its unbound form and co-crystallized with C_6 , C_{16} and C_{18} *D-erythro*-ceramides^[23] or (1*R*,3*R*)-HPAs^[24] of C_{13} to C_{16} acyl chain length, and DDR have been reported. Co-crystallized X-ray diffraction structures show that the CERT START domain has a big amphiphilic cavity in the center of the protein where a single Cer

(PDB IDs: 2E3N, 2E3O, 2E3P, 2E3Q, 2E3R, 2E3S), HPA or diacylglycerol molecule is inserted.^[23, 24] This cavity is composed of nine curved β -sheets covered by three α -helices (α_2 , α_3 , and α_4). Two loops are between β_5 – β_6 (Ω_1) and β_7 – β_8 (Ω_2). The unbound form (PDB ID: 2E3M) and Cer-bound structures show an opening surrounded by residues of α_3 and Ω_1 . This opening allows the terminus of the sphingosine backbone to get out of the cavity for C_{16} - and C_{18} -Cer. In HPA-bound structures (PDB IDs: 3H3Q, 3H3R, 3H3S, 3H3T) the cavities are completely closed by a conformational change of Trp473 on the Ω_1 loop. Regarding their polar heads, Cer, HPAs, and diacylglycerol display comparable conformations and interaction networks with the surrounding protein amino acid residues (typically Tyr553, Glu446, Gln467, Asn504, and to a lesser extent Arg442). The aliphatic chains of these ligands also follow common “lipidic pathways” along the hydrophobic walls of the cavity.^[25] A docking investigation (Supporting Information) using Molegro Virtual Docker 5.5 software (<http://www.clcbio.com/>) with the Moldock scoring scheme was performed.^[26] The set of crystallographic CERT structures gives information about invariant components of the structures, particularly the hydrogen bonding network surrounding the polar heads of the lipids. In order to improve the docking protocol this structural information was used to define templates (pharmacophores) in terms of chemical features (hydrogen donors, hydrogen acceptors, steric constraints). The docking procedure included ligand and residue flexibility (42 amino acids surrounding the binding site cavity). The 2E3P structure^[23] (chain A) was used in this analysis.

The resulting docking method was shown to reproduce the crystallographic arrangement of the natural ligands *D-erythro*-ceramides and the (1*R*,3*R*)-HPA inhibitors with different chain lengths, as well as (*S*)-didecanoylglycerol. Despite the high number of rotatable bonds, the simulated complexes with lowest energies were found to be in very good agreement with the co-crystal X-ray diffraction structures for all three ligand families (superimpositions for C_{16} -*D-erythro*-ceramide (RMSD 1.74) and (1*R*,3*R*)-HPA-13 (RMSD 0.79) in Figure 2; (*S*)-didecanoylglycerol (RMSD 1.02) in the Supporting Information). In each case, the network of hydrogen bonds surrounding the

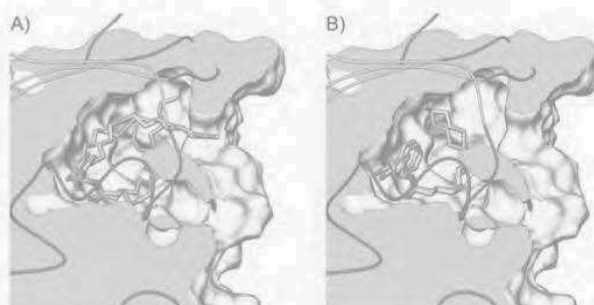


Figure 2. Superposition of the corresponding crystallographic structures (gray) with lowest energy docked poses (green) of A) C_{16} -*D-erythro*-ceramide and B) (1*R*,3*R*)-HPA-13. The orientation and protein surface (orange) clipping show the placement of the lipid polar heads at the left of the binding site cavity.

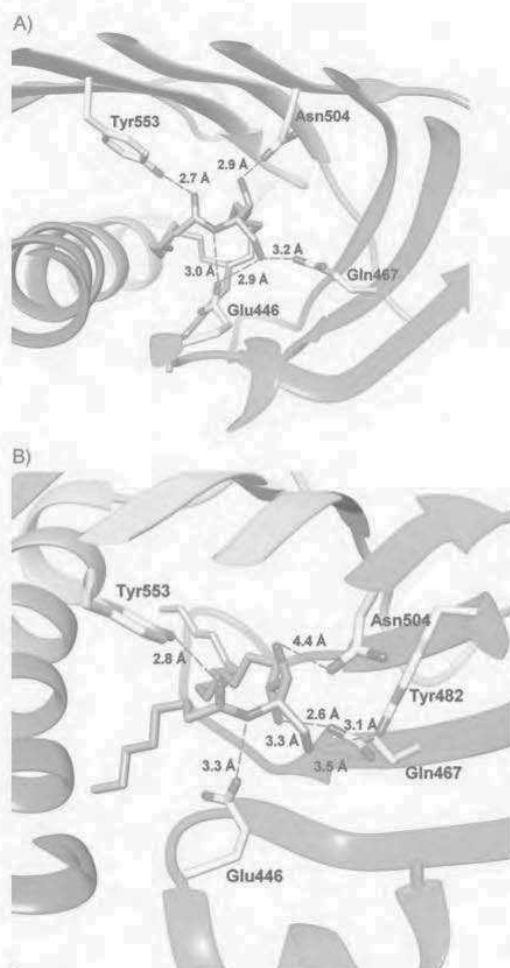


Figure 3. Calculated hydrogen-bond network in the docked pose with CERT START domain for A) C_{16} -D-erythro-ceramide and B) D-ribo-phytoceramide.

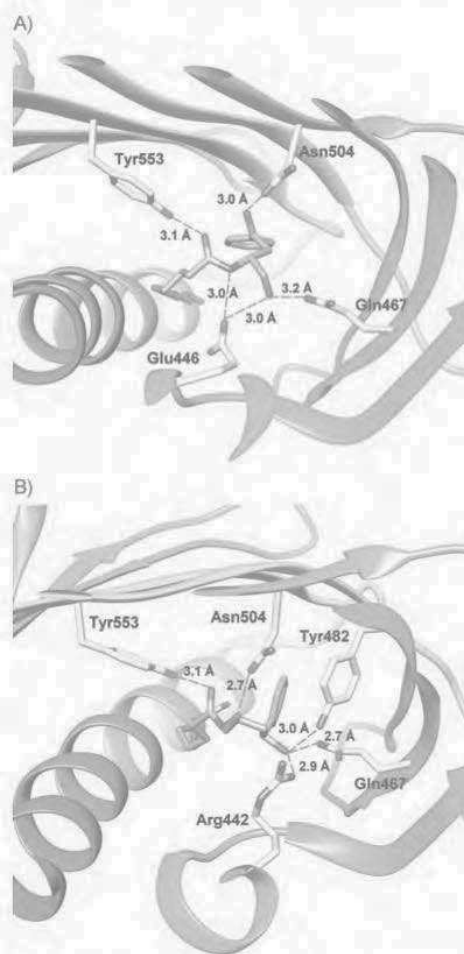


Figure 4. Calculated hydrogen-bond network in the docked pose with CERT START domain for A) (1R,3R)-HPA-12 and B) (1R,3S)-HPA-12.

polar heads of the ligands in the X-ray structure was accurately reproduced in the simulated complex (vide infra).

All the ligands of this first series were subjected to the in silico docking method (Supporting Information). The lowest-energy complex with D-ribo-phytoceramide, which was the best START domain ligand in our in vitro binding assay (vide supra, Figure 1), revealed that the polar head retains the core set of hydrogen-bond interaction of D-erythro-ceramides (Figure 3). This notably involves Tyr553 (with the amide carbonyl), Glu446 (with the amide NH but not with the primary alcohol), Gln467 (with the primary hydroxyl), and Asn504 (with the secondary hydroxyl at C-3). There were also stabilizing hydrogen bonds between Gln467 and the secondary hydroxyl at C-4 and between Tyr482 and the primary alcohol.

The two other compound exhibiting strong responses in our binding assay were (1R,3R)- and (1R,3S)-HPA-12, with comparable levels of recognition of the START domain.^[25] A close inspection of the calculated complex of both HPA-12 stereoisomers gave insightful information (Figure 4). The (1R,3R) config-

uration of HPA-12 was recently corrected,^[21] and the (1R,3S)-HPA-12 revised structure is stereochemically related to both D-ribo-phytoceramide and the (1S,2S,3R)-2-OH-HPA-12 derivatives mentioned above. Yet, in the reported X-ray diffraction study, the (1R,3S)-configuration was excluded by Kudo and co-workers, on the basis of a potential steric clash between the oxygen atoms of the hydroxyl and carbonyl groups.^[24] This observation was proposed to explain the better inhibitory activity of the (1R,3R)-derivative over other HPA stereoisomers.

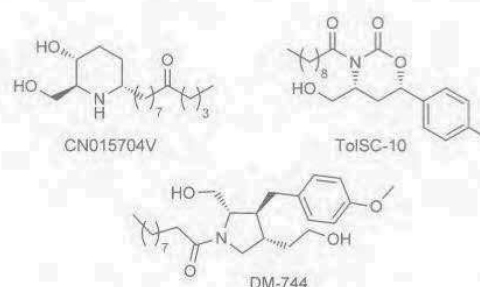
As with D-erythro-ceramides, the polar head of (1R,3R)-HPA-12 develops a network of hydrogen bond involving Tyr553 (with the amide carbonyl), Glu446 (with the amide hydrogen and the hydroxyl at C-1), and Gln467 (with the hydroxyl at C-1). The secondary hydroxyl at C-3 points away from the amide moiety (as noted by Kudo), and is thus directed towards the cavity.^[24] It develops an hydrogen bond with Asn504, thus mimicking that of the secondary hydroxyl group at C-3 of (phyto)ceramides.

The docked structure of (1*R*,3*S*)-HPA-12 shows a clearly different disposition and interaction pattern. Compared to the (1*R*,3*R*) isomer, conformational reorganization along the C-1–C-2–C-3 backbone accommodates the secondary alcohol at the 3*S* position, still pointing toward the protein cavity but in the opposite direction. The hydrogen bond with Asn504 is lost, and the C-3 secondary hydroxyl interacts instead with Gln467, Tyr482, and Arg442. This orientation and interaction pattern of the 3*S* secondary alcohol of (1*R*,3*S*)-HPA-12 reflects that of the hydroxyl group at C-4 of phytoceramide, which we also identified as a good ligand. Another difference is that Asn504 binds to the primary hydroxyl group, which, as a consequence of a reversed orientation, does not interact with Gln467.

Overall, as the two HPA diastereoisomers formed clearly distinct complexes with the START domain, this docking study supports the fact that the co-crystallized derivatives described by Kudo for the most active HPA stereoisomers possess the originally proposed (1*R*,3*R*) configuration, and not the corrected one (1*R*,3*S*). Taken together, these binding and docking data also indicate that the two diastereoisomers would display comparable protein recognition: both have the 1*R* configuration allowing good mimicry of the key C-1 fragment of *D*-erythro-ceramide. Complementary hydrogen bond networks could be developed with the 3*R* or the 3*S* secondary alcohol. This study provides the first direct comparison between the two epimers at C-3 of HPA in terms of their molecular recognition of the START domain of CERT.

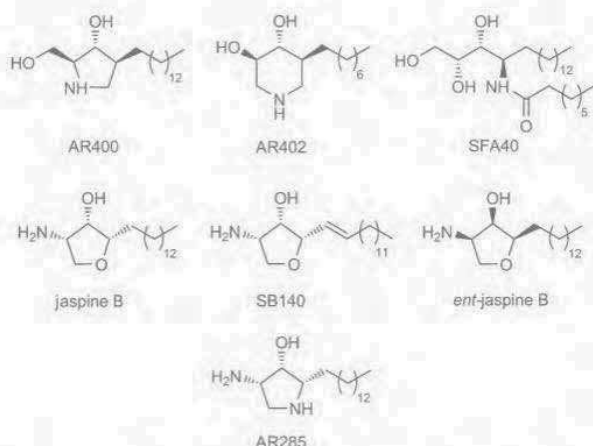
Next, we applied this method to a set of CERT ligand candidates. We focused on amphiphilic structures, which can potentially develop interactions with both polar and apolar regions of the binding cavity. Emphasis was put on cyclic structures of limited flexibility in our search for potential conformational mimicry of the ceramide polar head. The protonatable nitrogen atom was anticipated to mimic the amide moiety of ceramide in interacting with the carboxylate of the key residue

We previously designed C-alkyl iminosugars as mimics of the ceramide sphingosine backbone.^[27] These compounds are cytotoxic inhibitors of GlcCer production (raising cellular ceramide content). Pyrrolidine AR400 and the piperidine analogue AR402 are representative members of this series. We have also reported isomeric analogues of phytoceramide, resulting from permutations of the C-2 and C-4 substituents along the aliphatic skeleton.^[28] The significant CERT binding observed for phytoceramide prompted us to select SFA40 as one of these isophytoceramides. Finally, based on our finding that cytotoxic jaspine B triggered ceramide-induced apoptosis by inhibition of *de novo* SM biosynthesis,^[29] we included a synthetic sample of the natural compound and three cytotoxic analogues: the



unsaturated derivative SB140,^[30] the enantiomer *ent*-jaspine B,^[31] and its aza-derivative AR285.^[32] The amphiphilic derivatives CN015704V,^[33] TolSC-10, and DM-744^[34] were included to broaden the structural diversity.

The previously developed *in vitro* recognition study was applied to these ten candidates with the CERT START domain (Figure 5). Four compounds (TolSC-10, AR285, DM744, and CN015704 V) showed moderate binding (30–40% decrease in fluorescence compared to 72% for the natural ceramide). Five displayed more substantial binding (50–60% decrease), including notably the synthetic isophytoceramide SFA40, *ent*-jaspine B, and the unsaturated jaspine B analogue SB140. The most potent ligand was jaspine B (76% decrease, comparable to that for (1*R*,3*R*)-HPA-12).



Glu446. Inspired by our research on cytotoxic sphingolipid analogues and surrogates, we first selected seven compounds available in our laboratories.

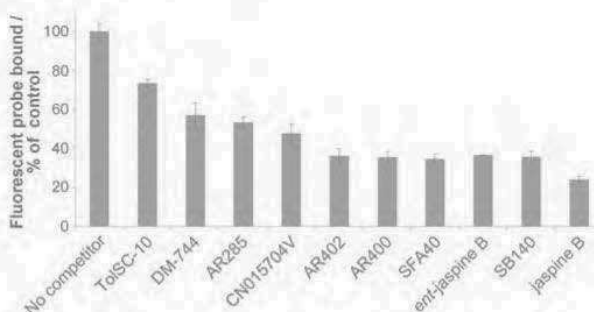


Figure 5. Binding assays of a Cer fluorescent probe to START domain in the presence of competitors. The bars represent the probe fluorescence as a percentage of the control (without competitor). Results are means from triplicate experiments.

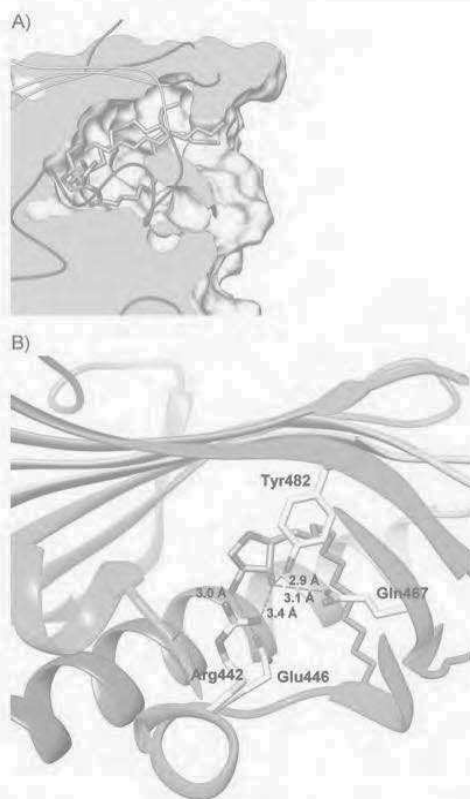


Figure 6. A) Superposition of the lowest energy jaspine B docked pose (green) with crystallographic structure of C_{16} -D-erythro-ceramide (gray; PDB ID: 2E3P chain A; colored by secondary structure). The orientation and protein surface (orange) clipping show the placement of lipid polar head on the left of the binding site cavity. B) Calculated hydrogen-bond network in the docked pose with CERT START domain for jaspine B.

All ten ligand candidates were investigated with the developed *in silico* docking method (see the Supporting Information). A superposition of the lowest energy pose of jaspine B with the crystallographic structure of C_{16} -ceramide in complex with the START domain suggests that the disposition of the ligand in the binding cavity parallels that of the natural ligand (Figure 6A). The tetrahydrofuran moiety of the natural compound was found to mimic the polar head of D-erythro-ceramide (protonated primary amine of jaspine B in place of the amide nitrogen atom, and secondary hydroxyl group in place of the characteristic primary alcohol of the sphingosine backbone). According to this docked complex, two key amino acid residues involved in binding to the D-erythro-ceramide are also implicated (Figure 6B). Glu446 (the most important for the Cer transfer activity)^[23] is strongly involved through both a hydrogen bond and an electrostatic interaction with the jaspine B protonated amino group. Gln467, also identified as important for CERT ceramide trafficking, is hydrogen-bonded to the secondary hydroxyl group. Tyr482 forms a strong hydrogen bond with the secondary alcohol of jaspine B as does, to a lesser extent, Arg442. The 14-carbon aliphatic chain of jaspine B also develops hydrophobic interaction along the lipophilic of the

binding cavity; this closely mimics the sphingosine backbone of the natural ligand. The docked complex shows strong interactions with Thr448 and His469, and, to a lesser extent, with Val472, Val480, and Glu575 (key residues for the recognition of the sphingolipidic skeleton of D-erythro-ceramides). Additionally, a strong stabilizing interaction was found with Lys470, which is known to contribute to the hydrophobicity of the cavity. A similar situation was observed for the unsaturated jaspine B synthetic analogue. The enantiomer *ent*-jaspine B showed a similar pattern of interaction in the docked pose. By partially reproducing the hydrogen-bond network and hydrophobic interactions of the CERT START domain with its natural ligand, the calculated binding mode supports the notion of strong competition between jaspine B (and its synthetic analogues) and the natural ligand for the protein cavity.

The strong binding of jaspine B is in line with the significant degree of START recognition observed for the related D-erythro-sphingosine. The greater extent of binding (76% reduction in fluorescence intensity; c.f. 50% for sphingosine) may be attributed to an entropic gain associated with the constrained structure of the jaspine B polar head, thus overcoming the lack of primary alcohol interaction. The amino group and the secondary alcohols of both jaspine B and sphingosine indeed display similar patterns of hydrogen bonding (see the Supporting Information). This suggests that rigid heterocyclic scaffolds presenting a protonatable amino group could be exploited further in the design of START domain ligands.

Identification of jaspine B as a CERT ligand opens up prospects regarding the intracellular target of this highly cytotoxic anhydrophyto-sphingosine. We previously established that jaspine B triggers apoptosis by raising cellular Cer through inhibition of its conversion into SM.^[29] Whether this action is due to inhibition of the enzymatic step or interference with CERT-mediated Cer trafficking is now open to question. Further experiments addressing this are *underway* in our laboratories.

Overall, this study constitutes the first attempt to identify novel CERT ligands by investigation at the molecular level. The developed docking protocol is a "filter" for the detection of compounds able to interact with the CERT cavity similarly to ceramide. This approach is the first step toward *in silico* design and optimization of CERT inhibitor candidates, potentially relevant as innovative ceramide-transfer-targeting therapeutic agents. Beyond its involvement in chemoresistance of cancer cells, the CERT machinery has been implicated in pathogen infection mechanism, thus potentially broadening the need for new inhibitors.^[35]

Acknowledgements

The financial support by CNRS, INSERM, Université Paul Sabatier and ANR (SphingoDR) is gratefully acknowledged. The French National Chemical Library is thanked for a gift of the CN015704V compound.

Keywords: cancer • ceramide • CERT • docking • sphingolipids

- [1] Y. A. Hannun, L. M. Obeid, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 139–150.
- [2] a) S. A. F. Morad, M. C. Cabot, *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 51–65; b) H. Furuya, Y. Shimizu, T. Kawamori, *Cancer Metastasis Rev.* **2011**, *30*, 567–576.
- [3] a) Y.-Y. Liu, R. A. Hill, Y.-T. Li, *Adv. Cancer Res.* **2013**, *117*, 59–89; b) M. Kartal Yandim, E. Apohan, Y. Baran, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2013**, *71*, 13–20.
- [4] M. T. Dimanche-Boitrel, A. Rebillard, *Handb. Exp. Pharmacol.* **2013**, *216*, 73–91.
- [5] J. Liu, B. S. Beckman, M. Foroozesh, *Future Med. Chem.* **2013**, *5*, 1405–1421.
- [6] a) T. H. Beckham, J. C. Cheng, S. T. Morrison, J. S. Norris, X. Liu, *Adv. Cancer Res.* **2013**, *117*, 1–36; b) A. Delgado, G. Fabrias, C. Bedia, J. Casas, J. L. Abad, *Anticancer Agents Med. Chem.* **2012**, *12*, 285–302.
- [7] A. H. Futerman, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2006**, *1758*, 1885–1892.
- [8] a) K. Hanada, K. Kumagai, S. Yasuda, Y. Miura, M. Kawano, M. Fukasawa, M. Nishijima, *Nature* **2003**, *426*, 803–809; b) T. Yamaji, K. Kumagai, N. Tomishige, K. Hanada, *IUBMB Life* **2008**, *60*, 511–518; c) W. A. Prinz, *Cell* **2010**, *143*, 870–874; d) CERT was also proposed to provide the C₁₆-ceramide substrate to ceramide kinase: D. S. Wijesinghe, J. C. Allegood, L. B. Gentile, T. E. Fox, M. Kester, C. E. Chalfant, *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 641–651.
- [9] a) A. Charruyer, S. M. Bell, M. Kawano, S. Douangpanya, T.-Y. Yen, B. A. Macher, K. Kumagai, K. Hanada, W. M. Holleran, Y. Uchida, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 16682–16692; b) S. Chandran, C. E. Machamer, *Biochem. J.* **2012**, *442*, 391–401.
- [10] C. Swanton, M. Marani, O. Pardo, P. H. Warne, G. Kelly, E. Sahai, F. Elustondo, J. Chang, J. Temple, A. A. Ahmed, J. D. Brenton, J. Downward, B. Nicke, *Cancer Cell* **2007**, *11*, 498–512.
- [11] A. J. X. Lee, R. Roylance, J. Sander, P. Gorman, D. Endesfelder, M. Kschischko, N. P. Jones, P. East, B. Nicke, S. Spassieva, L. M. Obeid, N. J. Birkbak, Z. Szallasi, N. C. McKnight, A. J. Rowan, V. Speirs, A. M. Hanby, J. Downward, S. A. Tooze, C. Swanton, *J. Pathol.* **2012**, *226*, 482–494.
- [12] L. Scheffer, P. R. Raghavendra, J. Ma, J. K. Acharya, *Anticancer Agents Med. Chem.* **2011**, *11*, 904–910.
- [13] K. Hanada, K. Kumagai, N. Tomishige, M. Kawano, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2007**, *1771*, 644–653.
- [14] T. Sugiki, K. Takeuchi, T. Yamaji, T. Takano, Y. Tokunaga, K. Kumagai, K. Hanada, H. Takahashi, I. Shimada, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 33706–33718.
- [15] M. Kawano, K. Kumagai, M. Nishijima, K. Hanada, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 30279–30288.
- [16] A.-G. Thorsell, W. H. Lee, C. Persson, M. I. Siponen, M. Nilsson, R. D. Busam, T. Kotenyova, H. Schöler, L. Lehtilä, *PLoS One* **2011**, *6*, e19521.
- [17] Inhibitors of the SM synthesis preventing CERT-dependent ceramide extraction from ER were also described: F. Hullin-Matsuda, N. Tomishige, S. Sakai, R. Ishitsuka, K. Ishii, A. Makino, P. Greimel, M. Abe, E. L. Laviad, M. Lagarde, H. Vidal, T. Saito, H. Osada, K. Hanada, A. H. Futerman, T. Kobayashi, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 24397–24411.
- [18] a) S. Yasuda, H. Kitagawa, M. Ueno, H. Ishitani, M. Fukasawa, M. Nishijima, S. Kobayashi, K. Hanada, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 43994–44002; b) M. Ueno, H. Kitagawa, H. Ishitani, S. Yasuda, K. Hanada, S. Kobayashi, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7863–7865.
- [19] S. Yasuda, H. Kitagawa, M. Ueno, H. Ishitani, M. Fukasawa, M. Nishijima, S. Kobayashi, K. Hanada, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 24162–24162. Correction of ref. [18a].
- [20] Y. Nakamura, R. Matsubara, H. Kitagawa, S. Kobayashi, K. Kumagai, S. Yasuda, K. Hanada, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3688–3695.
- [21] a) A. Đuriš, T. Wiesenganger, D. Moravčíková, P. Baran, J. Kožisek, A. Daich, D. Berkeš, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1642–1645; b) M. Ueno, Y.-Y. Huang, A. Yamano, S. Kobayashi, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2869–2871.
- [22] K. Kumagai, S. Yasuda, K. Okemoto, M. Nishijima, S. Kobayashi, K. Hanada, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 6488–6495.
- [23] N. Kudo, K. Kumagai, N. Tomishige, T. Yamaji, S. Wakatsuki, M. Nishijima, K. Hanada, R. Kato, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 488–493.
- [24] N. Kudo, K. Kumagai, R. Matsubara, S. Kobayashi, K. Hanada, S. Wakatsuki, R. Kato, *J. Mol. Biol.* **2010**, *396*, 245–251.
- [25] S. Combemale, C. Santos, F. Rodriguez, V. Garcia, C. Galaup, C. Frongia, V. Lobjois, T. Levade, C. Baudoin-Dehoux, S. Ballereau, Y. Génisson, *ASC Adv.* **2013**, *3*, 18970–18984.
- [26] R. Thomsen, M. H. Christensen, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3315–3321.
- [27] a) V. Faugeron, Y. Génisson, N. Andrieu-Abadie, S. Colié, T. Levade, M. Baltas, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 4437–4439; b) A. Rives, Y. Génisson, V. Faugeron, C. Zedde, C. Lepetit, R. Chauvin, N. Saffon, N. Andrieu-Abadie, S. Colié, T. Levade, M. Baltas, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2474–2489.
- [28] A. Rives, C. Baudoin-Dehoux, N. Saffon, N. Andrieu-Abadie, Y. Génisson, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 8163–8170.
- [29] Y. Salma, E. Lafont, N. Therville, S. Carpentier, M.-J. Bonnafé, T. Levade, Y. Génisson, N. Andrieu-Abadie, *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *78*, 477–485.
- [30] Y. Salma, S. Ballereau, C. Maaliki, S. Ladeira, N. Andrieu-Abadie, Y. Génisson, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 3227–3243.
- [31] C. Santos, I. Fabing, N. Saffon, S. Ballereau, Y. Génisson, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 7227–7233.
- [32] A. Rives, S. Ladeira, T. Levade, N. Andrieu-Abadie, Y. Génisson, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 7920–7923.
- [33] This compound was kindly provided from the French National Chemical Library and is the co-property of Dr. C. Guillou (Institut de Chimie des Substances Naturelles, UPR 2301, Gif-sur-Yvette, France).
- [34] Compounds ToISC-10 and DM-744 were prepared by Dr. D. Berkeš and Prof. A. Daich. Their syntheses will be reported elsewhere.
- [35] a) I. Derré, R. Swiss, H. Agaisse, *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1002092; b) C. A. Elwell, S. Jiang, J. H. Kim, A. Lee, T. Wittmann, K. Hanada, P. Melancon, J. N. Engel, *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1002198.

Received: July 9, 2014

Published online on September 26, 2014

IV. Recherche de nouveaux antagonistes potentiels de CERT

La méthode *in silico* développée s'est révélée être un filtre efficace dans l'identification de nouveaux ligands du domaine START de CERT. Cette méthode d'identification peut ainsi être appliquée à la recherche de nouveaux ligands inhibiteurs potentiels du transport de céramide par CERT selon une approche exploratoire par criblage virtuel ou par conception rationnelle.

1) Criblage

a) Application du filtre *in silico*

La méthode d'arrimage moléculaire développée et validée est appliquée à une ligandothèque définie par des molécules existantes déjà synthétisés ou par des molécules accessibles synthétiquement. Cette ligandothèque comprend :

- des analogues de la jaspine B, puisque la jaspine B a déjà été identifiée comme un ligand de START au cours de la validation de la méthode d'arrimage moléculaire.
- des molécules d'origine naturelle ou des analogues à squelette amphiphile de type sphingoïde, connues pour interagir avec le métabolisme des sphingolipides. Un des critères de sélection était la présence dans la partie polaire de la molécule d'un motif aminodiol de configuration absolue donnée, susceptible de mimer la tête polaire de la Sph :

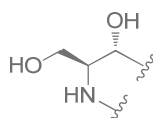


Figure 28 – Motif aminodiol sélectionné

- des dérivés iminosucres, à quatre chaînons du type pénarésidine, à cinq chaînons, à six chaînons du type fagomine, isofagomine, déoxyiminoxylitol et déoxynojirimycine et à sept chaînons du type azépane.
- des dérivés lactames à cinq ou six chaînons.
- des composés issus de la Chimiothèque Nationale. La sélection des molécules s'est concentrée sur des structures amphiphiles, cycliques ou acycliques, comportant un atome d'azote, plusieurs atomes d'oxygène et des chaînes lipophiles.

Plus d'une centaine de composés ont ainsi été criblés virtuellement dans la cavité du domaine START. Les composés constituant la ligandothèque et leurs résultats de criblage *in silico* sont rassemblés dans les tableaux suivants.

Criblage in silico d'analogues de la Jaspine B

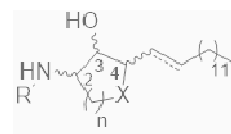


Tableau 9 – Résultats de la modélisation moléculaire pour les analogues de la Jaspine B

Ligand	n	stéréochimie			X	R	insaturation	MolDock	Rerank	HA	LE1	LE3
		2	3	4								
L001	1	S	S	S	O	H	non	-132,06	-106,73	21	-6,29	-5,08
L002	1	S	S	R	O	H	non	-119,99	-94,05	21	-5,71	-4,48
L003	1	S	S	S	O	H	oui	-133,28	-107,05	21	-6,35	-5,10
L004	1	R	R	R	O	H	non	-127,63	-106,65	21	-6,08	-5,08
L005	1	S	S	S	O	(CO)C ₁₅ H ₃₁	non	-223,21	-148,17	38	-5,87	-3,89
L006	1	S	S	S	O	(SO ₂)C ₁₅ H ₃₁	non	-198,80	-152,78	39	-5,10	-3,92
L007	1	S	S	S	O	C ₁₆ H ₃₃	non	-198,04	-144,26	37	-5,35	-3,90
L008	2	S	S	S	O	H	non	-129,70	-107,51	22	-5,90	-4,89
L009	1	S	S	S	S	H	non	-123,42	-103,55	21	-5,88	-4,93

Criblage in silico de molécules d'origine naturelle

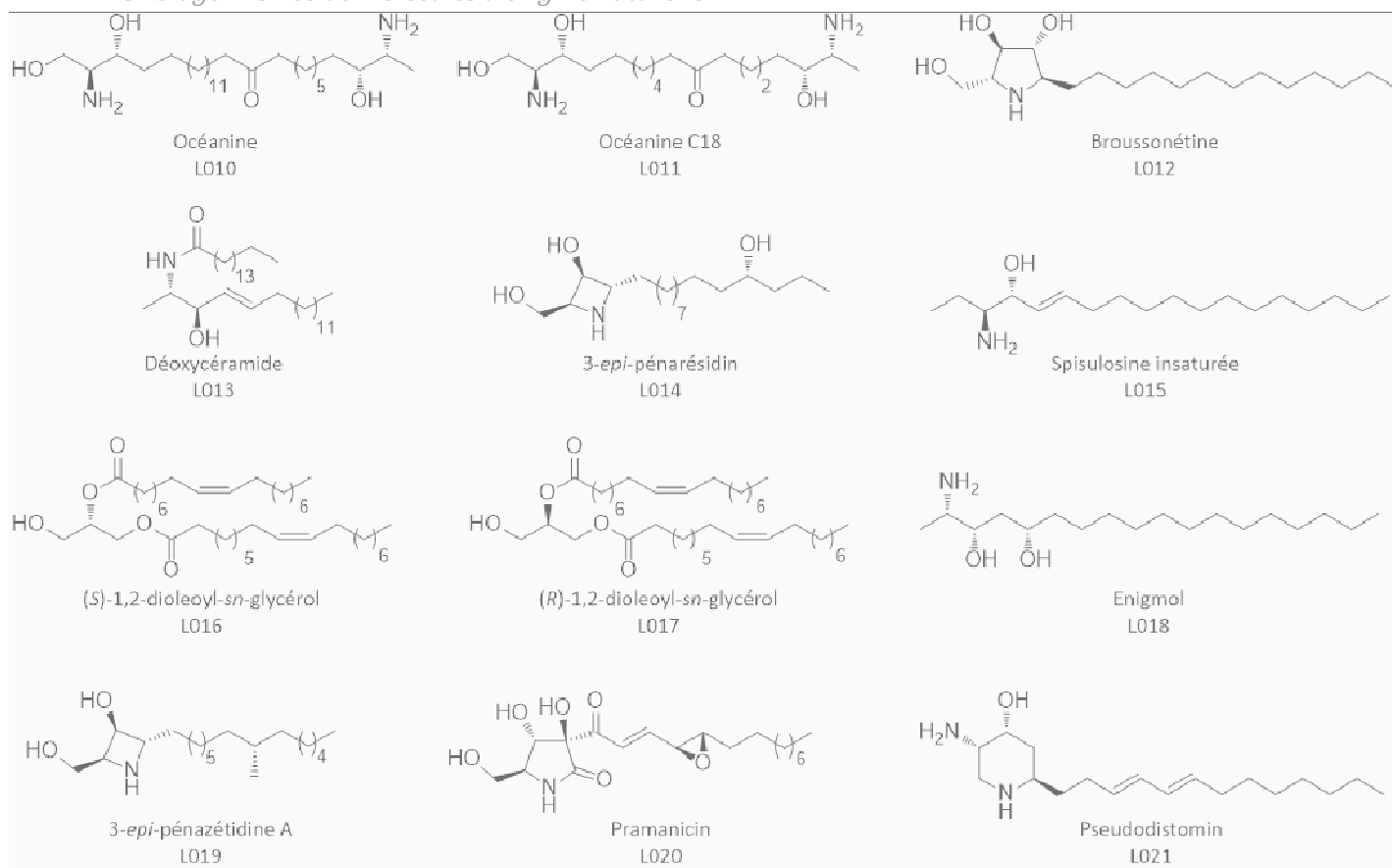


Tableau 10 – Résultats de la modélisation moléculaire pour les composés sélectionnés d'origine naturelle

Ligand	MolDock	Rerank	HA	LE1	LE3
L010	-153,43	-94,72	34	-4,51	-2,79
L011	-125,76	-101,66	24	-5,24	-4,24
L012	-128,17	-94,28	22	-5,83	-4,29
L013	-191,39	-140,31	37	-5,17	-3,79
L014	-119,56	-83,60	22	-5,43	-3,80
L015	-116,25	-92,97	20	-5,81	-4,65
L016	-202,80	-146,69	44	-4,61	-3,33
L017	-226,57	-166,51	44	-5,15	-3,78
L018	-124,12	-102,91	21	-5,91	-4,90
L019	-123,08	-99,70	22	-5,59	-4,53
L020	-130,65	-104,12	26	-5,03	-4,00
L021	-124,24	-106,17	21	-5,92	-5,06

Criblage in silico d'analogues iminosucres

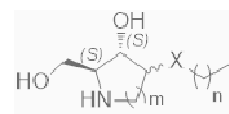


Tableau 11 – Résultats de la modélisation moléculaire pour les dérivés iminosucres de type I

Ligand	n	m	configuration	X	MolDock	Rerank	HA	LE1	LE3
L022	12	1	S	CH ₂	-121,73	-95,48	22	-5,53	-4,34
L023	12	1	R	CH ₂	-120,35	-96,51	22	-5,47	-4,39
L024	12	1	S	O	-117,19	-91,96	22	-5,33	-4,18
L025	12	1	R	O	-131,21	-100,76	22	-5,96	-4,58
L026	12	2	S	CH ₂	-123,46	-94,36	23	-5,37	-4,10
L027	12	2	R	CH ₂	-116,43	-96,86	23	-5,06	-4,21
L028	12	2	S	O	-118,30	-97,26	23	-5,14	-4,23
L029	12	2	R	O	-118,45	-98,40	23	-5,15	-4,28

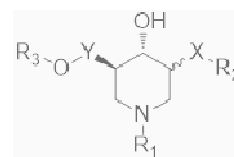


Tableau 12 – Résultats de la modélisation moléculaire pour les dérivés iminosucres de type II

Ligand	configuration	X	Y	R ₁	R ₂	R ₃	MolDock	Rerank	HA	LE1	LE3
L030	<i>S</i>	CH ₂	CH ₂	H	C ₁₃ H ₂₇	H	-119,20	-102,25	23	-5,18	-4,45
L031	<i>R</i>	CH ₂	CH ₂	H	C ₁₃ H ₂₇	H	-109,73	-98,38	23	-4,77	-4,28
L032	<i>S</i>	O	CH ₂	H	C ₁₃ H ₂₇	H	-114,08	-99,16	23	-4,96	-4,31
L033	<i>R</i>	O	CH ₂	H	C ₁₃ H ₂₇	H	-112,61	-92,29	23	-4,90	-4,01
L034	<i>S</i>	CH ₂	∅	H	C ₁₃ H ₂₇	H	-109,32	-95,06	22	-4,97	-4,32
L035	<i>R</i>	CH ₂	∅	H	C ₁₃ H ₂₇	H	-113,36	-95,63	22	-5,15	-4,35
L036	<i>S</i>	O	∅	H	C ₁₃ H ₂₇	H	-126,21	-101,73	22	-5,74	-4,62
L037	<i>R</i>	O	∅	H	C ₁₃ H ₂₇	H	-113,79	-94,36	22	-5,17	-4,29
L038	<i>S</i>	O	∅	C ₁₄ H ₂₉	C ₁₃ H ₂₇	H	-211,00	-155,08	36	-5,86	-4,31
L039	<i>S</i>	O	∅	H	C ₁₃ H ₂₇	C ₁₃ H ₂₇	-185,88	-142,63	35	-5,31	-4,08
L040	<i>S</i>	O	∅	C ₁₄ H ₂₉	H	H	-144,76	-115,43	23	-6,29	-5,02
L041	<i>S</i>	O	∅	(CO)C ₁₃ H ₂₇	H	H	-137,78	-114,84	24	-5,74	-4,78
L042	-	∅	∅	C ₁₄ H ₂₉	∅	H	-129,49	-106,21	22	-5,89	-4,83
L043	-	∅	∅	(CO)C ₁₃ H ₂₇	∅	H	-121,39	-104,51	23	-5,28	-4,54
L044	<i>R</i>	O	∅	C ₁₄ H ₂₉	H	H	-131,52	-105,80	23	-5,72	-4,60

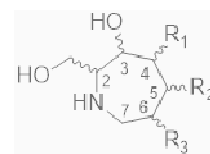


Tableau 13 – Résultats de la modélisation moléculaire pour les dérivés iminosucre de type III

Ligand	configuration					R ₁	R ₂	R ₃	MolDock	Rerank	HA	LE1	LE3
	2	3	4	5	6								
L045	S	S	S	-	R	OC ₁₃ H ₂₇	-	OC ₁₃ H ₂₇	ND	ND	38	ND	ND
L046	S	S	S	-	S	OC ₁₃ H ₂₇	-	OC ₁₃ H ₂₇	-202,17	-135,08	38	-5,32	-3,55
L047	S	S	R	-	-	OC ₁₃ H ₂₇	-	-	-121,83	-102,09	24	-5,08	-4,25
L048	S	S	R	-	S	OC ₁₃ H ₂₇	-	OC ₁₃ H ₂₇	-206,30	-145,32	38	-5,43	-3,82
L049	S	S	R	-	S	OC ₆ H ₁₃	-	OC ₆ H ₁₃	-116,28	-89,87	24	-4,85	-3,74
L050	R	R	S	R	-	OH	OC ₁₃ H ₂₇	-	-146,16	-111,63	25	-5,85	-4,47
L051	R	R	R	-	S	OH	-	OC ₁₃ H ₂₇	-127,60	-99,89	25	-5,10	-4,00
L052	R	R	S	S	-	OH	OC ₁₃ H ₂₇	-	-132,76	-100,73	25	-5,31	-4,03
L053	R	R	R	-	R	OH	-	OC ₁₃ H ₂₇	-142,34	-111,58	25	-5,69	-4,46
L054	S	S	S	R	-	OH	OC ₁₃ H ₂₇	-	ND	ND	25	ND	ND
L055	S	S	S	-	S	OH	-	OC ₁₃ H ₂₇	-154,40	-117,86	25	-6,18	-4,71
L056	S	S	S	S	-	OH	OC ₁₃ H ₂₇	-	-134,65	-106,14	25	-5,39	-4,25
L057	S	S	S	-	R	OH	-	OC ₁₃ H ₂₇	-139,75	-108,46	25	-5,59	-4,34

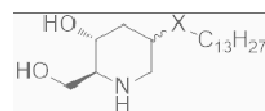


Tableau 14 – Résultats de la modélisation moléculaire pour les dérivés iminosucre de type IV

Ligand	configuration	X	MolDock	Rerank	HA	LE1	LE3
L058	R	CH ₂	-131,97	-103,86	23	-5,74	-4,52
L059	S	CH ₂	-124,30	-100,00	23	-5,40	-4,35
L060	R	O	-139,13	-111,23	23	-6,05	-4,84
L061	S	O	-133,98	-104,51	23	-5,83	-4,54
L062	-	CH=CH (E)	-125,19	-98,33	23	-5,44	-4,28
L063	-	CH=CH (Z)	-118,94	-101,77	23	-5,17	-4,42

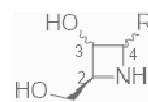


Tableau 15 – Résultats de la modélisation moléculaire pour les analogues iminosucres de type V

Ligand	stéréochimie		R	MolDock	Rerank	HA	LE1	LE3
	3	4						
L064	R	S	C ₁₄ H ₂₉	-120,04	-93,72	21	-5,72	-4,46
L065	R	R	C ₁₄ H ₂₉	-120,13	-94,06	21	-5,72	-4,48
L066	S	S	C ₁₄ H ₂₉	-122,61	-94,63	21	-5,84	-4,51
L067	S	R	C ₁₄ H ₂₉	-122,86	-93,84	21	-5,85	-4,47

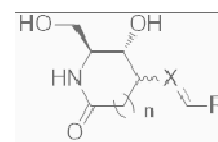
Criblage in silico d'analogues lactames

Tableau 16 – Résultats de la modélisation moléculaire pour les dérivés lactames

Ligand	n	stéréochimie	X	insaturation	R	MolDock	Rerank	HA	LE1	LE3
L068	0	R	CH ₂	non	C ₁₂ H ₂₅	-129,93	-103,11	23	-5,65	-4,48
L069	0	S	CH ₂	non	C ₁₂ H ₂₅	-129,28	-104,90	23	-5,62	-4,56
L070	0	R	O	non	C ₁₂ H ₂₅	-125,66	-98,03	23	-5,46	-4,26
L071	0	S	O	non	C ₁₂ H ₂₅	-114,55	-93,24	23	-4,98	-4,05
L072	1	S	CH ₂	non	C ₁₂ H ₂₅	-127,27	-95,91	24	-5,30	-4,00
L073	1	R	CH ₂	non	C ₁₂ H ₂₅	-114,92	-92,50	24	-4,79	-3,85
L074	1	S	CH ₂	oui	C ₁₂ H ₂₅	-135,26	-108,06	24	-5,64	-4,50
L075	1	R	CH ₂	oui	C ₁₂ H ₂₅	-141,11	-107,07	24	-5,88	-4,46

Criblage in silico de molécules issues d'une sélection de la Chimiothèque Nationale

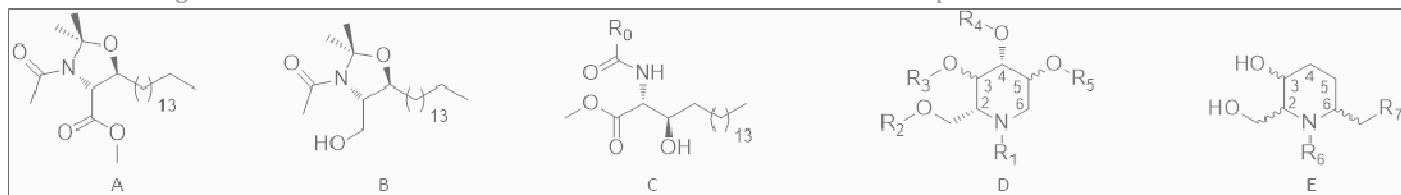


Tableau 17 – Résultats de la modélisation moléculaire pour la sélection des composés de la Chimiothèque Nationale

Ligand	type	stéréochimie					R ₀	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	MolDock	Rerank	Heavy atoms	LE1	LE3
		2	3	4	5	6													
L076	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-158,33	-125,95	29	-5,46	-4,34
L077	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-152,39	-117,24	27	-5,64	-4,34
L078	C	-	-	-	-	-	Me	-	-	-	-	-	-	-	-151,04	-120,30	26	-5,81	-4,63
L079	C	-	-	-	-	-	Ph	-	-	-	-	-	-	-	-167,71	-122,63	31	-5,41	-3,96
L080	D	R	R	R	S	-	-	C ₉ H ₁₉	Bn	H	Bn	H	-	-	-182,07	-104,26	34	-5,35	-3,07
L081	D	R	S	R	S	-	-	C ₈ H ₁₇	H	C ₈ H ₁₇	H	C ₈ H ₁₇	-	-	-197,39	-142,95	35	-5,64	-4,08
L082	D	R	R	R	R	-	-	C ₈ H ₁₇	H	C ₈ H ₁₇	H	C ₈ H ₁₇	-	-	-211,02	-142,09	35	-6,03	-4,06
L083	D	R	R	S	S	-	-	C ₈ H ₁₇	Bn	H	Bn	Bn	-	-	-216,82	-137,93	40	-5,42	-3,45
L084	D	R	R	R	S	-	-	C ₉ H ₁₉	Bn	Bn	Bn	H	-	-	-220,38	-139,19	41	-5,38	-3,39
L085	D	R	R	R	R	-	-	C ₉ H ₁₉	Bn	Bn	Bn	H	-	-	-223,97	-164,38	41	-5,46	-4,01
L086	D	R	R	S	R	-	-	C ₈ H ₁₇	Bn	H	Bn	C ₈ H ₁₇	-	-	-221,92	-153,81	41	-5,41	-3,75
L087	D	R	R	R	S	-	-	C ₈ H ₁₇	Bn	C ₈ H ₁₇	Bn	H	-	-	-223,12	-150,59	41	-5,44	-3,67
L088	D	R	S	S	S	-	-	C ₈ H ₁₇	Bn	H	Bn	C ₈ H ₁₇	-	-	-201,65	-133,69	41	-4,92	-3,26
L089	D	R	R	R	R	-	-	C ₈ H ₁₇	Bn	C ₈ H ₁₇	Bn	H	-	-	-217,44	-151,19	41	-5,30	-3,69
L090	D	R	R	R	S	-	-	C ₈ H ₁₇	Bn	C ₈ H ₁₇	Bn	C ₈ H ₁₇	-	-	-241,00	-179,24	49	-4,92	-3,66
L091	D	R	S	R	S	-	-	C ₈ H ₁₇	Bn	C ₈ H ₁₇	Bn	C ₈ H ₁₇	-	-	-223,00	-163,98	49	-4,55	-3,35
L092	D	R	R	R	R	-	-	C ₈ H ₁₇	Bn	C ₈ H ₁₇	Bn	C ₈ H ₁₇	-	-	-241,76	-154,88	49	-4,93	-3,16
L093	D	R	S	R	S	-	-	C ₄ H ₉	H	C ₄ H ₉	H	C ₄ H ₉	-	-	-135,64	-97,10	23	-5,90	-4,22
L094	E	R	S	-	-	R	-	-	-	-	-	-	Me	C ₂ H ₂₅	-119,24	-96,99	22	-5,42	-4,41
L095	E	R	S	-	-	S	-	-	-	-	-	-	H	C ₉ H ₁₈ (CO)C ₂ H ₅	-117,59	-96,18	22	-5,35	-4,37
L096	E	S	R	-	-	R	-	-	-	-	-	-	H	C ₇ H ₁₄ (CO)C ₄ H ₉	-129,70	-103,11	22	-5,90	-4,69
L097	E	R	S	-	-	R	-	-	-	-	-	-	H	(R) C ₁₀ H ₂₀ CH(OH)CH ₃	-122,05	-89,64	22	-5,55	-4,07
L098	E	R	S	-	-	R	-	-	-	-	-	-	H	(R) C ₉ H ₁₈ CH(OH)C ₂ H ₅	-120,17	-96,87	22	-5,46	-4,40
L099	E	R	S	-	-	R	-	-	-	-	-	-	Me	(S) C ₁₀ H ₂₀ CH(OH)CH ₃	-117,44	-96,67	23	-5,11	-4,20
L100	E	R	S	-	-	R	-	-	-	-	-	-	H	(S) C ₁₀ H ₂₀ CH(OH)CH ₃	-127,25	-101,91	22	-5,78	-4,63

Bilan du criblage *in silico*

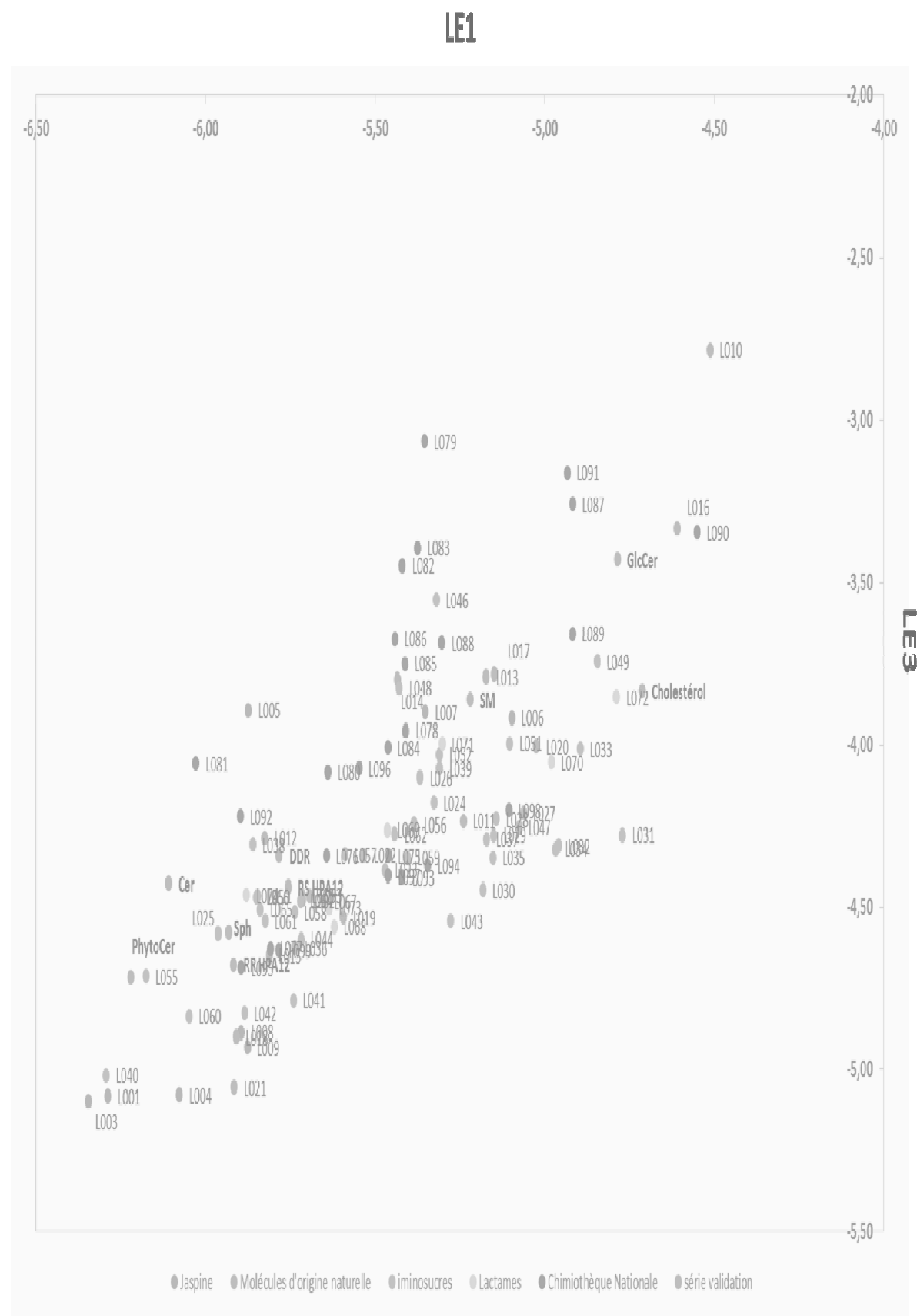


figure 29 – Corrélation du LE1 et LE3 pour l'ensemble des composés criblés *in silico*

La représentation graphique de *LE3* en fonction du *LE1* (cf. Figure 29) permet de repérer rapidement les meilleurs ligands du domaine START, correspondant aux plus petites valeurs de ces descripteurs. Ce criblage virtuel de la ligandothèque fait ainsi ressortir les ligands L001, L003, L004, L040, L055 et L060 (cf. Figure 30).

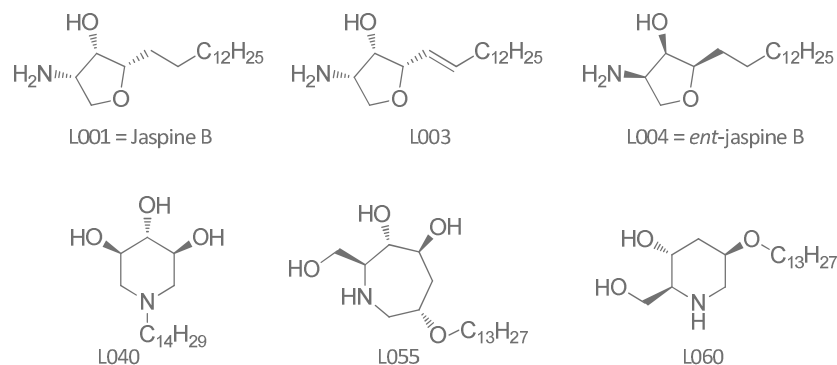


Figure 30 – Structure des ligands identifiés au cours du criblage *in silico*

L001, L003 et L004 correspondent respectivement à la Jaspine B, SB140 et l'*ent*-jaspine B, déjà identifiés comme ligands du domaine START au cours de la validation de la méthode.

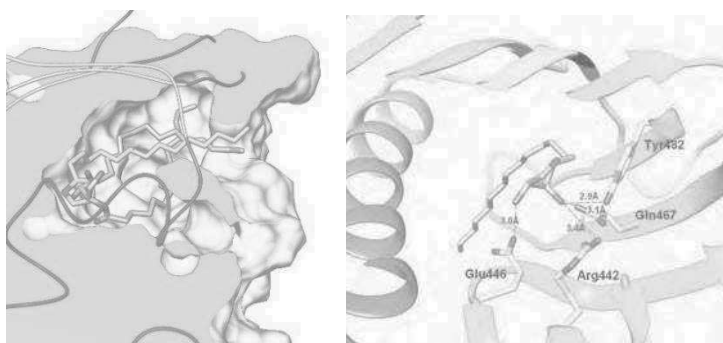


Figure 31 – Pose retenue de la jaspine B superposée au céramide C16 et réseau de liaisons hydrogènes calculé entre la jaspine B et le domaine START

La jaspine B était alors apparue comme le meilleur ligand d'origine naturelle de CERT potentiellement antagoniste de la protéine. L'analyse détaillée de la pose retenue de la jaspine B indique que ce composé serait capable de reproduire partiellement le réseau de liaisons hydrogènes développé par le céramide au site de liaison du domaine START grâce sa tête polaire mimant celle du céramide (cf. Figure 31). L'activité de ce composé et de ses analogues sera détaillée dans le Chapitre III.

L040 correspond à un iminosucre type didéoxyiminoxylitol (cf. Figure 32), L055 à un iminosucre type azépane (cf. Figure 33) et L060 à un iminosucre type 1,3-didéoxy-*altro*-nojirimycine (cf. Figure 34). L'analyse détaillée des meilleures poses de ces composés montre de fortes interactions avec les résidus Glu446, Gln467, Tyr482, Tyr553 et Asn504, indispensables pour la reconnaissance avec le domaine START. Par ailleurs, les chaînes lipidiques de ces iminosucres miment le squelette sphingoïde et la chaîne amide du céramide.

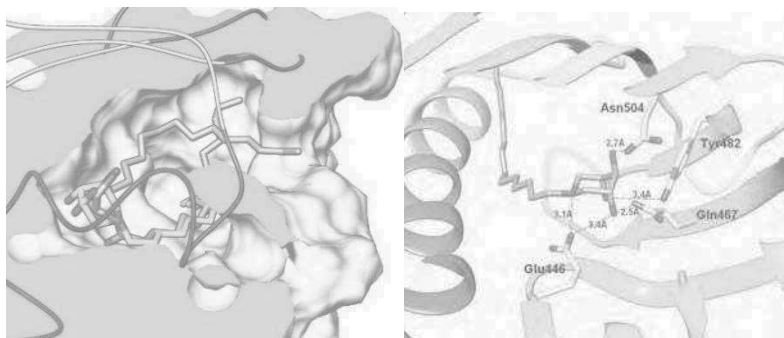


Figure 32 – Pose retenue de L040 superposée au céramide C16 et réseau de liaisons hydrogènes calculé entre L040 et le domaine START

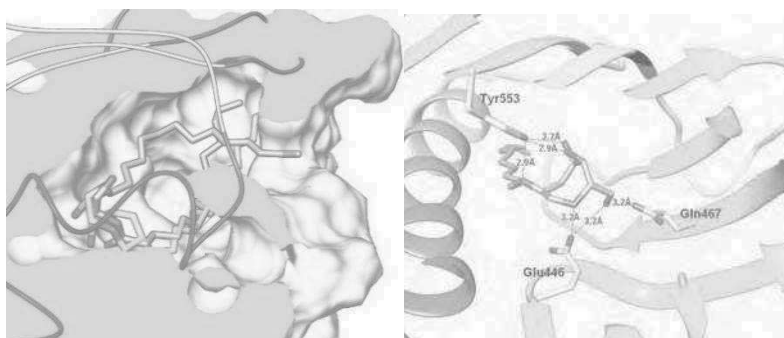


Figure 33 – Pose retenue de L055 superposée au céramide C16 et réseau de liaisons hydrogènes calculé entre L055 et le domaine START

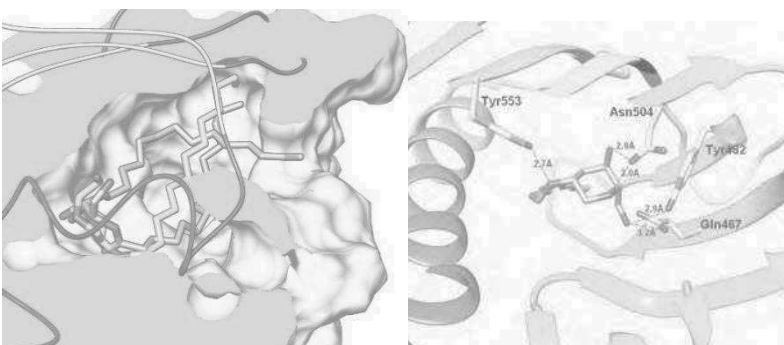


Figure 34 – Pose retenue de L060 superposée au céramide C16 et réseau de liaisons hydrogènes calculé entre L060 et le domaine START

D'après la modélisation moléculaire, ces familles d'iminosucre ont été identifiées comme ligands potentiels du domaine START de CERT. Ces structures sont donc intéressantes à développer de façon rationnelle pour optimiser leur interaction avec la protéine.

b) Criblage haut-débit *in vitro*

En parallèle du criblage virtuel *in silico*, une campagne de criblage *in vitro* a été réalisée. Le test basé sur l'intensité de fluorescence (FLINT) mis au point au laboratoire nécessite des étapes de séparation et une quantité importante en réactifs (notamment en protéine) ne permettant pas, en pratique, le criblage intensif de composés ni l'évaluation de larges gammes de concentration en ligand. Un nouveau test de liaison au domaine START, basé sur le transfert d'énergie par résonance en fluorescence (FRET), miniaturisable et automatisable a été ainsi développé en collaboration avec les Drs. Laurence Fleury et Frédéric Ausseil sur la plateforme intégrée de criblage de Toulouse PICT, IBISA au sein de l'Unité de Service et de Recherche 3388-CNRS/Pierre Fabre-Pharmacochimie de la Régulation épigénétique du Cancer (ETAC). Les propriétés spectrales spécifiques au FRET permettent de réaliser ces expériences en phase homogène. De plus, la fluorescence résiduelle, émise par les échantillons chimiques, les tampons ou la protéine, ayant des temps de vie de l'ordre de la nanoseconde, peut être éliminée par une lecture du signal en temps-résolu (TR-FRET).

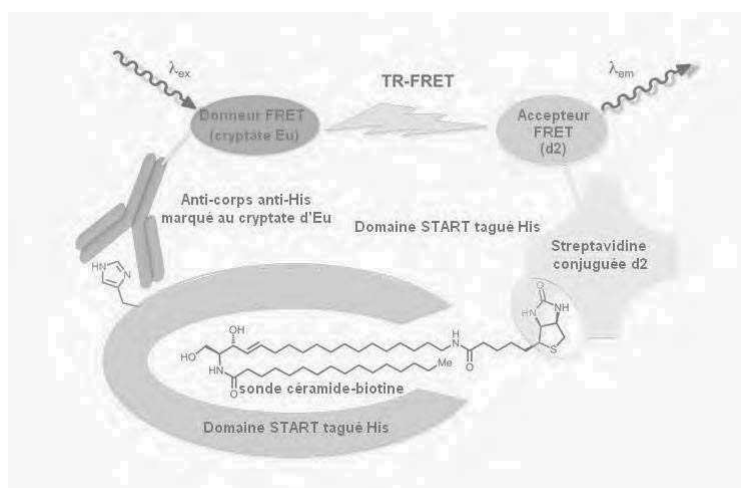


Figure 35 – Test de liaison TR-FRET entre le domaine START et la sonde céramide-biotine

Dans cet essai TR-FRET, le cryptate d'euprium liée à un anticorps anti-histidine est le donneur de signal FRET. Le d2 porté par la streptavidine, est le partenaire accepteur. Lorsque la sonde céramide-biotine, synthétisée précédemment au laboratoire,³² est liée au domaine START, les deux partenaires du signal FRET sont proches, il y a donc émission du signal. Lorsqu'un compétiteur se lie au domaine START préférentiellement au céramide-biotine, les partenaires de FRET ne sont plus suffisamment proches, il n'y a pas apparition de la fluorescence.

Ce test a ainsi permis d'évaluer à haut-débit la liaison au domaine START d'une collection de composés issus de la Chimiothèque Nationale Essentielle dans le cadre du programme « PIR-Therapeutic Innovation » du CNRS. Ces travaux sont détaillés dans l'article suivant.⁴⁰



Development of a CERT START Domain–Ceramide HTRF Binding Assay and Application to Pharmacological Studies and Screening

Journal of Biomolecular Screening
2015, Vol. 20(6) 779–787
© 2015 Society for Laboratory
Automation and Screening
DOI: 10.1177/1087057115573402
jbx.sagepub.com
 SAGE

Laurence Fleury¹, Céline Faux¹, Cécile Santos²,
Stéphanie Ballereau², Yves Génisson², and Frédéric Ausseil¹

Abstract

Sphingomyelin (SM) metabolism deregulation was recently associated with cell metastasis and chemoresistance, and several pharmacological strategies targeting SM metabolism have emerged. The ceramide (Cer) generated in the endoplasmic reticulum (ER) is transferred to the Golgi apparatus to be transformed into SM. CERamide Transfer (CERT) protein is responsible for the nonvesicular trafficking of Cer to Golgi. Blocking the CERT-mediated ER-to-Golgi Cer transfer is an interesting antioncogenic therapeutic approach. Here, we developed a protein-lipid interaction assay for the identification of new CERT-Cer interaction inhibitors. Frequently used for protein-protein interaction by enzymatic and analyte dosage assays, homogeneous time-resolved fluorescence technology was adapted for the first time to a lipid-protein binding assay. This test was developed for high-throughput screening, and a library of 672 molecules was screened. Seven hits were identified, and their inhibitory effect quantified by EC₅₀ measurements showed binding inhibition three orders of magnitude more potent than that of HPA12, the unique known CERT antagonist to date. Each compound was tested on an independent test, confirming its high affinity and pharmacological potential.

Keywords

ceramide, CERT (CERamide Transfer), homogenous time-resolved fluorescence (TR-FRET), HTRF, high-throughput screening, assay development

Introduction

Dysregulated sphingolipid metabolism is widely associated with cell tumorigenicity, proliferation, metastasis, and chemoresistance.¹ Ceramide (Cer) is the backbone molecule of complex sphingolipids such as gangliosides and sphingomyelin (SM), an abundant component of the eukaryotic cells' outer membrane. Cer was shown to act as a mediator of cell death, proliferation, and survival, whereas SM has been described as a source of fast Cer release, compared with its de novo biosynthesis, through sphingomyelinase activity. Cer is synthesized in the endoplasmic reticulum (ER) upon action of one of the six Cer synthases and the complete synthesis of SM, resulting from the addition of a phosphocholine head group to Cer, takes place in the Golgi apparatus.

Sphingolipids were shown to be associated with cell membrane structural and functional properties, influencing drug influx, sequestration, and efflux from cells.² Variations in sphingolipid membrane composition were observed between anticancer drug-resistant cells compared with the drug-sensitive ones, and SM level increases were shown to

be associated with doxorubicin resistances in P388, T47D, and MCF-7/ADR cells.^{3,4} Strategies to interfere with sphingolipid metabolism were largely studied. The inhibition of various enzymatic targets, such as sphingomyelin synthase (SMSs) and Glc-ceramide synthase, have already been proposed as potential anticancer approaches.⁵

The CERamide Transfer (CERT) protein is specifically responsible for Cer trafficking from ER-to-Golgi along de novo SM biosynthesis,⁶ suggesting that inhibition

¹Unité de Service et de Recherche CNRS, Toulouse, France

²LSPCMIB, CNRS-Université Paul Sabatier-Toulouse III, Toulouse, France

Received Nov 14, 2014, and in revised form Dec 19, 2014. Accepted for publication Jan 9, 2015.

Corresponding Author:

Frédéric Ausseil, Unité de Service et de Recherche CNRS-Pierre Fabre n°3388 ETaC, CRDPF, 3 avenue H. Curien, 31035 Toulouse cedex 01, France.

Email: frederic.ausseil@pierre-fabre.com

of CERT-mediated Cer transfer might be a promising strategy for anticancer therapy.^{1,7} Notably, it was shown that CERT depletion leads to chemotherapy benefit and mediates cytotoxic and cancer cell death through autophagy induction.⁸ Because *N*-(3-hydroxy-1-hydroxymethyl-3-phenylpropyl) alkanamides (HPAs) are, to date, the only class of CERT antagonist described,⁹ the discovery of new molecular archetypes antagonizing the Cer binding to CERT is of determining importance to fully assess the anticancer therapeutic potential of CERT inhibition.

CERT contains several functional domains, among which is a C-terminal START domain (about 210 residues) that has a long amphiphilic cavity specifically binding *D*-erythro-ceramide. This START domain is per se responsible for the Cer transport activity of the CERT protein.¹⁰ We recently developed a START domain binding assay for the identification of Cer binding competitors as potential inhibitors of Cer trafficking by CERT.¹¹ However, this procedure, requiring high reagent amounts and phase separation steps, was not suitable for extensive pharmacological analysis and screening, limiting the mechanistic analysis of START interaction with Cer as well as the identification of new Cer competitors.

We thus sought a more practical and sensitive CERT binding assay that could be amenable to miniaturization and automation. We focused our attention on the fluorescence resonance energy transfer (FRET) detection mode. Because of specific spectral properties, FRET allows homogeneous assays to run without separation steps such as centrifugation, washing, filtration, or magnetic partitioning.¹² Moreover, the fluorescence background produced by chemical samples, buffers, or proteins, generally presenting lifetimes in the nanosecond range, could be eliminated using time-resolved methodology (TR-FRET). Homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF¹³), an homogeneous-phase TR-FRET technology, has been developed for high-throughput screening (HTS)¹⁴ and was already successfully applied to screen diverse compound libraries.^{15,16}

Here, TR-FRET was applied for the first time to monitor a protein-lipid, namely, START-Cer, interaction. Thanks to a specifically designed ω -biotinylated Cer (BioCer) probe,¹¹ we were able to measure a TR-FRET between an europium kryptate linked to an anti-histidine antibody, as the donor, and d2 carried by streptavidine, as the acceptor. The performance of this miniaturized assay was carefully analyzed and shown to allow large screening experiments. A library of 672 compounds was screened, and seven hits were identified.

Materials and Methods

Products

Streptavidin-d2 conjugate (product No. 610SADLA) and europium kryptate-labeled monoclonal anti-histidine antibody (product No. 61HISKLA) were obtained from Cisbio

Bioassays (Codolet, France). Human COL4A3ABP recombinant histidine-tagged protein fragment (START; product No. ab95897) was obtained from Abcam. Biotinylated Cer probe (BioCer, or *N*-((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxy-18-(5-(2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamido)octadec-4-en-2-yl)palmitamide) and fluorescent Cer probe (*N*-((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxy-18-((7-nitrobenzo[*c*] [1,2,5]oxadiazol-4-yl)amino)octadec-4-en-2-yl)palmitamide) were synthesized according to Combemale et al.¹¹ HPA12 ((1*R*, 3*S*)-HPA12) was a gift from Dr. Dušan Berkeš (Department of Organic Chemistry, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovakia).¹⁷ HPA12 was identified as a specific inhibitor of ceramide trafficking in 2001, before the report of the CERT-associated nonvesicular ceramide transfer mechanism.¹⁸ Among the four diastereoisomeric HPAs, only a single pair of enantiomers (1*R**,3*R**) corrected lately as (1*R**,3*S**),¹⁹ was resolved to be individually evaluated as inhibitors of de novo SM production in living cells. The (1*R*,3*R*)-stereochemistry was thus initially identified as the most potent stereoisomer.⁹ The stereochemical assignment of the most active HPA12 stereoisomer was recently revised as (1*R*,3*S*).^{17,20}

Fluorescence Intensity Binding Assay

START was dissolved in Tris-buffered saline solution (TBS) to 1 μ M concentration. For negative control, START was not added in this TBS solution. Of the fluorescent Cer probe, 1 μ M of was added to the tube, and the mixture was incubated at 37 °C for 30 min. Then TALON metal affinity resin (30 mL of 50% [v/v] preequilibrated with wash buffer) was added to the mixture and incubated for 10 min at room temperature. After centrifugation and washes with TBS (75 mL) containing increasing imidazole concentration, the supernatant was collected as the unbound fraction. To liberate the protein-bound fraction to the TALON resin, the resin was suspended in 250 mM imidazole and incubated for 5 min at room temperature. After centrifugation, the supernatant was collected as the bound fraction. For more details, see Combemale et al.¹¹

Optimized HTRF Assay

The assay was carried out in a final volume of 20 μ L. Six microliters of the START protein solution to a final concentration of 1 μ M and 2 μ L of 5% of DMSO (or compounds diluted in 5% of DMSO) were incubated in Corning 384-well, low-volume, white, round-bottom polystyrene NBS microplates (product No. 3673). After incubation for 30 min at 37 °C, 2 μ L of BioCer solution was added to a final concentration of 1 μ M. Five microliters of streptavidin-d2 conjugate and 5 μ L of europium kryptate-labeled monoclonal anti-histidine antibody were added in detection buffer (20 mM of HEPES buffer pH 8.5, 800 mM of potassium

fluoride, 1 mM of bovine serum albumin in H₂O). For the europium kryptate-labeled monoclonal anti-histidine antibody, 2.1 ng per well was added and 50 ng was added for streptavidin-d2. After 18 h of incubation at room temperature, the time-resolved fluorescence was measured using an Envision plate reader (Perkin Elmer; $\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ and } 665 \text{ nm}$; 100 μs delay time). The donor fluorescence emission was measured at 590 nm instead of 620 nm in accordance with Envision apparatus and Cisbio recommendation. All modifications of this standardized protocol are noted in the legend of the figures.

HTRF Data Handling

HTRF Ratio and FRET Signal. The HTRF ratio readout was calculated as a two-wavelength signal ratio: $(665 \text{ nm}/590 \text{ nm}) \times 10^4$ according to manufacturer recommendations. FRET signal was defined as $(\text{HTRF compound ratio} - \text{HTRF negative ratio})/\text{HTRF blank ratio}$. The HTRF negative ratio was $(665 \text{ nm}/590 \text{ nm}) \times 10^4$ of wells containing streptavidin-d2 conjugate and europium kryptate-labeled monoclonal anti-histidine antibody. The HTRF blank ratio was $(665 \text{ nm}/590 \text{ nm}) \times 10^4$ of wells containing europium kryptate-labeled monoclonal anti-histidine antibody.

P/N Signal. The positive control is the maximum HTRF ratio with 1% DMSO. The negative control is the HTRF negative ratio.

Percentage of Inhibition. FRET-positive controls were performed by dispensing DMSO 5%. This maximal FRET signal value obtained was set to 0% inhibition. The FRET negative ratio was set to 100% of inhibition.

The FRET signal calculation was performed as follows:

Percentage of inhibition = $100 - (100 * \text{FRET compound}) / \text{FRET with 1\% of DMSO}$. All curve fittings, including the one-phase exponential association (defined by the equation: $Y = Y_{\text{max}} * (1 - \exp(-k * X))$), were performed with Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Z' Factor. This factor was calculated with 32 assays for each control as defined by Zhang et al.²¹

Data Reproducibility. Except for the screening experiment itself, all experiments were performed in duplicate or triplicate.

Screening of Chemical Compounds of the Chimiothèque Nationale Essentielle

The Chimiothèque Nationale Essentielle (CNE; an Essential Compound Library) is a subset of 640 compounds, selected according to molecular diversity criteria, representative of

the CN (French National Chemical Library; “Chimiothèque Nationale”) and recently used in HTS notably by Ruggiu et al.²² All structures present in this synthetic products and natural compounds database are accessible on the Website <http://chimiotheque-nationale.enscm.fr>. CNE was conditioned into 96-well microplates. Compounds were diluted and split in two plates of 384 wells to a final concentration of 50 μM . Thirty-two compounds known or not to inhibit the START-Cer interaction were tested in the same condition as CNE. Two microliters of compound in 5% of DMSO were added to a final concentration of 5 μM in 1% of DMSO.

Results

CERT mediates the nonvesicular ER-to-Golgi trafficking of Cer synthesized de novo at the ER and transferred to the *trans*-Golgi involving a movement of the START domain by an hypothetical “neck-swing model”²³ (Fig. 1). In the lumen of the *trans*-Golgi, Cer is converted to SM by the SMSs. CERT contains several functional domains: a PH domain, an FFAT domain, and a START domain that interacts directly with Cer (Fig. 1A). To discover antagonists of the START-Cer interaction, a biologically relevant Cer fluorescent probe was developed¹¹ (Fig. 1B, left). According to the corresponding assay procedure, the START-Cer interaction is monitored by fluorescence detection after resin binding, washing, and centrifugation in elution buffer. This heterogeneous binding assay (Fluorescence INTensity Test; FLINT) includes numerous steps, such as centrifugation, which makes extensive pharmacological studies and automation difficult.¹¹ Moreover, the high amount of the purified START protein domain required to carry out FLINT experiments renders it inappropriate for large screening experiments.

Our objective was thus to develop a miniaturized test to assess the START-Cer interaction on the basis of the homogeneous HTRF assay methodology (Fig. 1B, right).

Development of an HTRF Assay to Measure START-Mediated Cer Binding

For the FLINT, a 1 μM fluorescent Cer probe solution was incubated with 2 μM of histidine-tagged START protein for 30 min. After resin addition, washing, centrifugations, and elution, fluorescence was measured in the bound fraction (Fig. 2A). For the HTRF assay, we started with the same START and biotinylated Cer probe (BioCer) concentrations. Kinetic analysis of the europium kryptate-START/Cer-streptavidin-d2 complex formation showed that a significant HTRF ratio was obtained after approximately 3 h of incubation (Fig. 2B). Time-course analysis showed that the HTRF ratio increase was dependent on time but not the

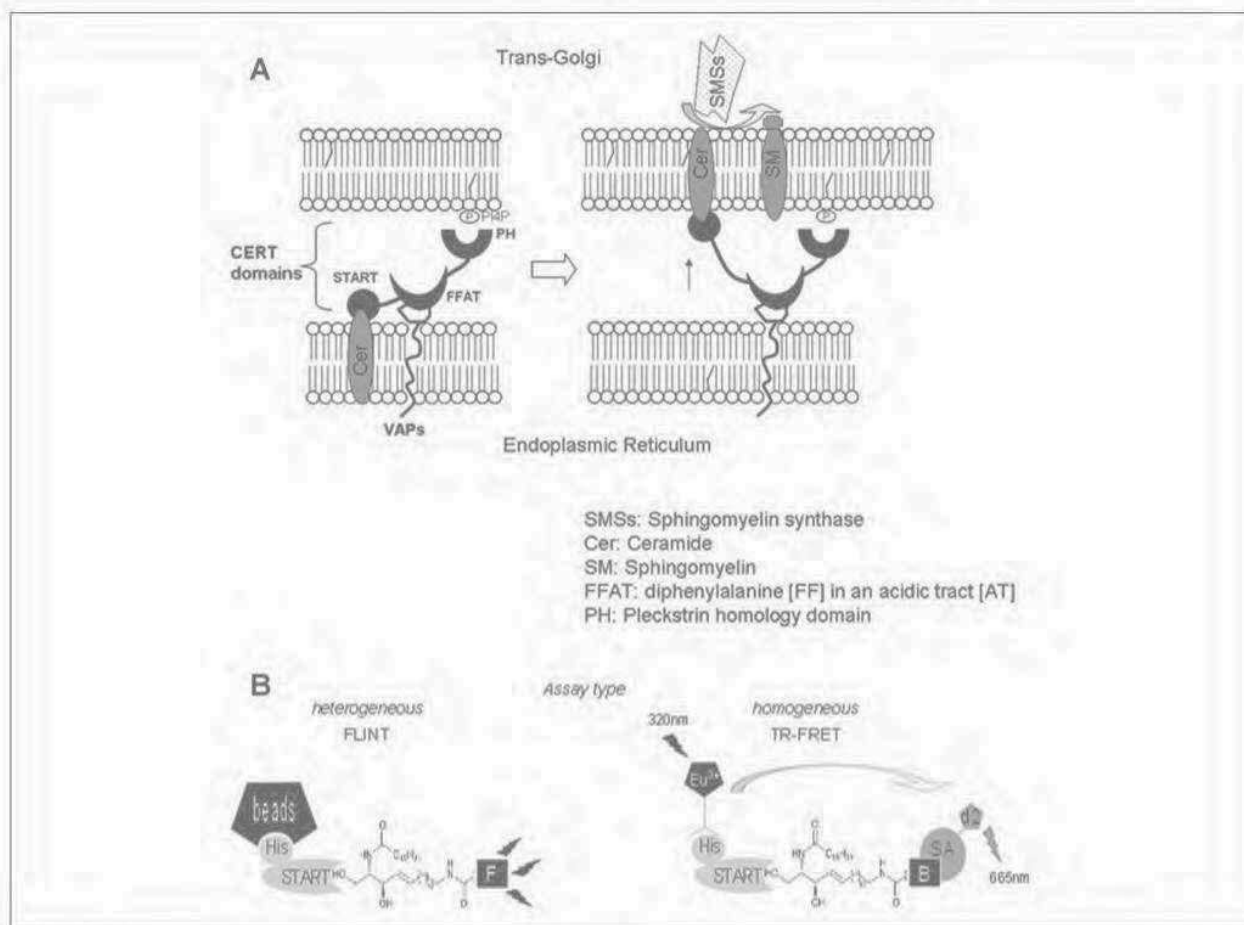


Figure 1. (A) CERamide Transfer (CERT) mediates nonvesicular transfer of Cer from the endoplasmic reticulum (ER) to Golgi. CERT contains several functional domains. The START domain interacts with Cer. The FFAT motif of CERT binds the VAMP-associated proteins at the ER membrane. The pleckstrin homology domain (PH domain) of Cer binds the PI-4 monophosphate, a member of the phosphatidylinositol phosphates, at the Golgi apparatus. Cer is produced at the ER and transported from the ER to the trans-Golgi, where it is converted to sphingomyelin (SM) by the sphingomyelin synthase (SMSs) localized in the lumen of trans-Golgi. The figure shows the hypothetical "neck-swing model" involving a movement of the START domain. An alternative "short-distance shuttle model" for the transfer mechanism has also been proposed (for review, see Handa²³). **(B)** Assays developed for START-Cer's interaction. In the left panel, heterogeneous Fluorescence INTensity (FLINT) binding assay. The START-histidine domain was recognized by TALON's beads. The START-Cer interaction was evaluated from detection of fluorescence of the fluorescent Cer in the binding fraction. In the right panel, homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET): Homogeneous time-resolved fluorescence technology (Cisbio®). The interaction between the protein START and the Cer was detected by the transfer of energy in close proximity between a donor, europium kryptate (Eu³⁺), and acceptor's fluorochrome (d2). Energy of excitation of europium kryptate at 320 nm is transferred at 590 nm to the acceptor d2, which emits at 665nm.

increase of fluorescent background signal (as blank or negative signal; Fig. 3A).

Various amounts (i.e., 50 ng or 150 ng per well) of europium kryptate-labeled anti-histidine antibody were tested (Fig. 3B). At 50 ng per well, kinetic analysis showed a good fit with a one-phase association profile ($R^2 = 0.9524$), confirming that the reaction followed the scheme: $P + L \rightarrow [PL]$. The signal increased with time, reaching equilibrium after 24 h with a maximum of 4 FRET units (data not shown). Half of the START sites (50% HRTF signal) were occupied

in 4 h, which was quite slow according to the protein-protein interaction. In contrast, at 150 ng per well, no specific response was observed ($R^2 = 0.1335$). A greater amount of kryptate increased the curve slope but also increased the background signal and decreased the P/N ratio (Fig. 3B). Reaction with 50 ng of kryptate showed the most significant signal.

Ligand binding depends partially on electrostatic interactions; therefore, pH variations can greatly influence binding parameters by directly altering the ionization state of

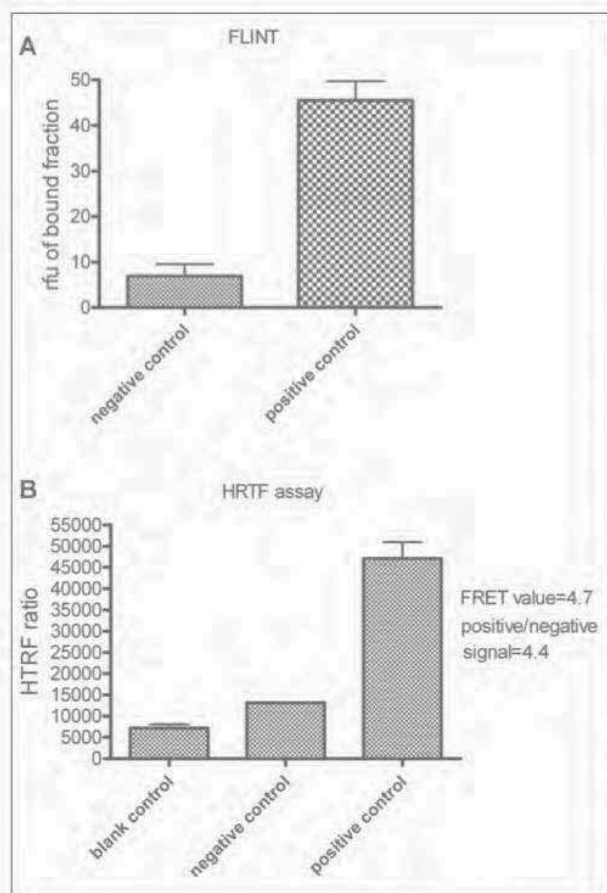


Figure 2. (A) Fluorescence Intensity Test (FLINT) assay. Fluorescent Cer was incubated with tris-buffered saline solution (for negative control) or START protein domain (for positive control) for 30 min at 37 °C. TALON's beads were added. After centrifugations and washes, fluorescence in the highest concentrated of imidazole elution fraction was detected. (B) HTRF assay. The HTRF ratio was calculated as described in the Materials and Methods section. Blank control contained only monoclonal antibody labeled with europium kryptate. The negative control's wells contained donor and acceptor fluorochrome without START and Cer. Positive control was HTRF ratio obtained with START-Cer's interaction. The fluorescence resonance energy transfer value was calculated as explained in the Materials and Methods section.

chemical groups interacting with the ligand. The protein-lipid interaction could be influenced by pH variations as well. We thus investigated the effect of decreasing pH (Fig. 3C). The positive HTRF ratio at pH 8.5 is higher compared with pH 7.5. We also controlled the influence of temperature on the assay (Fig. 3D) and observed that incubation at 37 °C suppressed the signal compared with 30 °C. This loss of FRET signal at a higher temperature could be associated with faster reagent degradation after this unusually long incubation time. As Cer is dissolved in ethanol, we

investigated the effect of ethanol concentration on FRET signal (Fig. 3E) and showed that binding measurements tolerates only a narrow window of alcohol concentration.

Finally, before automation, we investigated the binding kinetic parameters. As the curve obtained with 50 ng of kryptate (Fig. 3B) described the same reaction scheme as the protein-protein interaction (fitting of the one-phase association curve ($R^2 = 0.9524$), the START dose-response curve was fitted to a Michaelis-Menten equation (Fig. 3F). Saturation binding data analysis (also visualized by Scatchard plot inserted) defined a START protein K_d of 0.8 μM for the BioCer probe. We decided to fix the START protein concentration at 1 μM , close to K_d for the following experiments, and read it at 18 h to be at equilibrium.^{24–26}

Assay Calibration and Robustness

Experiments performed with HPA12—a competitive inhibitor of a START-Cer interaction¹⁸ (Fig. 4A)—showed a time- and dose-dependent inhibitory effect of HPA12, confirming the specificity of the assay.

As previously observed, the kinetic of the START-Cer interaction is slow. Thus, to favor the identification of inhibitors, we optimized the sensitivity of the assay with a preincubation step (Fig. 4B). In sequence 1, START is incubated with the BioCer probe and the competitor. In sequence 2, START is incubated for 30 min at 37 °C with the competitor, and the BioCer probe is added. A higher sensibility to HPA12 inhibition is observed with sequence 2 compared with sequence 1. The EC_{50} of HPA12, applying sequence 2, was found to be 4.2 μM with the sigmoid dose-response algorithm ($R^2 = 0.967$; Fig. 4C). Finally, we determined that a maximum DMSO concentration of 1% is compatible with our procedure (Fig. 4D).

To evaluate the ability of the assay to accurately detect START-Cer binding competitors among a series of molecules, we measured the well-established Z' factor.²¹ As observed in Figure 5A, Z' factor values were systematically superior to 0.5 after 6 h of treatment, indicating that our assay can robustly detect inhibitors in large compound collections.

Hit Identification from a Set of 672 Molecules

The CNE and 32 original molecules were screened at a 5 μM final concentration (Fig. 5B). A total of 22 hits were identified as compounds presenting a percentage inhibition superior to the mean percentage inhibition of the 672 molecules plus three standard deviations (i.e., 49% inhibition of START-Cer binding). Seven hits were selected for dose-response analysis (Fig. 5C) and showed an EC_{50} ranging from 700 to 32 nM, that is, three orders of magnitude more affine than HPA12.

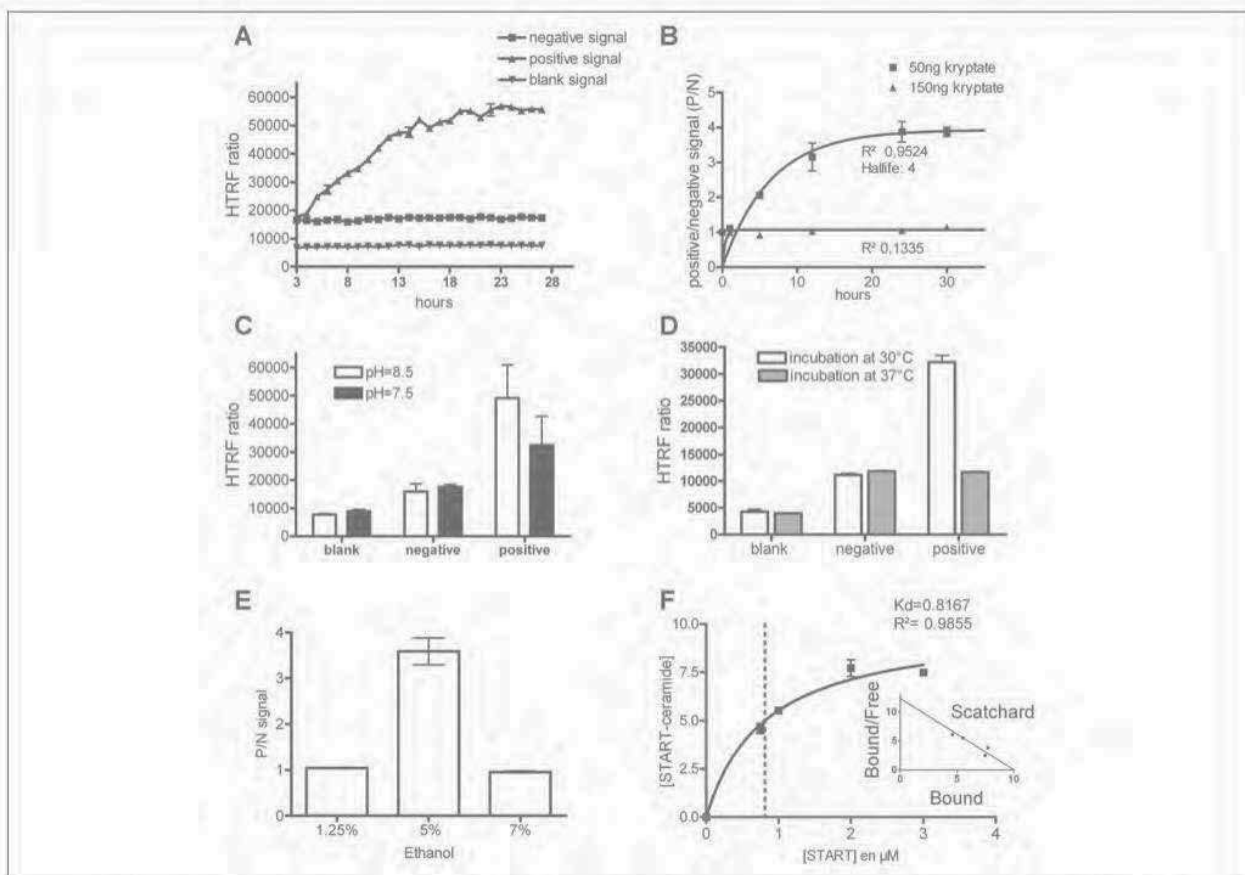


Figure 3. (A) Kinetics of homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF) ratio of controls. Measurements were done every 30 min for 28 h. (B) Evolution of the ratio signal depending of europium kryptate quantity: kinetics for two different quantities of monoclonal antibody against histidine and labeled europium kryptate. Positive/negative signal and fluorescence resonance energy transfer (FRET) value were calculated as described in the Materials and Methods section. Coefficients of correlations give the quality of a fitting to the one-phase association kinetic. (C) Evolution of the HTRF ratio depending on pH. Ratio of positive/negative signal at 18 h in buffer detection at pH 8.5 or pH 7.5 was calculated. (D) Temperature effect on the HTRF ratio at 18 h. (E) Effect of ethanol percentage on P/N signal at 18 h. (F) Fitting values of a saturation binding curve to determine K_d and B_{max} . To visualize saturation binding data, a Scatchard plot is represented in the right panel.

Hit Validation with FLINT

To distinguish valuable hit molecules from false-positives, hits were tested in the FLINT at a 2.5 μM concentration in comparison with HPA12. Results are presented in Figure 6, showing a maximum level of recovery between both assays and confirming the activity of the seven hits.

Discussion

Blocking SM de novo synthesis via the inhibition of the CERT-Cer interaction is an innovative strategy to restore the intracellular concentration of the proapoptotic Cer metabolite.^{7,8} To access to CERT-mediated Cer transfer, several technologies were developed. They include the measurement of radiolabeled SM (inter)membrane extraction/transfer by CERT in a

cell-free system and chromatographic analysis.^{18,27} Because they are overly complicated, these technologies could not be applied to a screening strategy. Fluorescent SM detection in cell extracts or in microscopic analysis were developed²⁸ and a screening of a compound library performed.²⁴ However, these assays were indirect and did not target CERT trafficking itself, requiring further experimental investigations to identify the active molecule mechanism of action.

Another type of assay was designed to target directly Cer transfer via CERT. It relies on surface plasmon resonance to calculate CERT-mediated extraction of Cer from the reticulum membrane.²⁹ Even so, automation of this assay is not possible. More recently, phosphorylation of CERT at Ser315 was shown to enhance the interaction of CERT with the ER membrane.¹⁹ Both semi-intact cells and cell-free protocols were used to measure Cer transportation. These

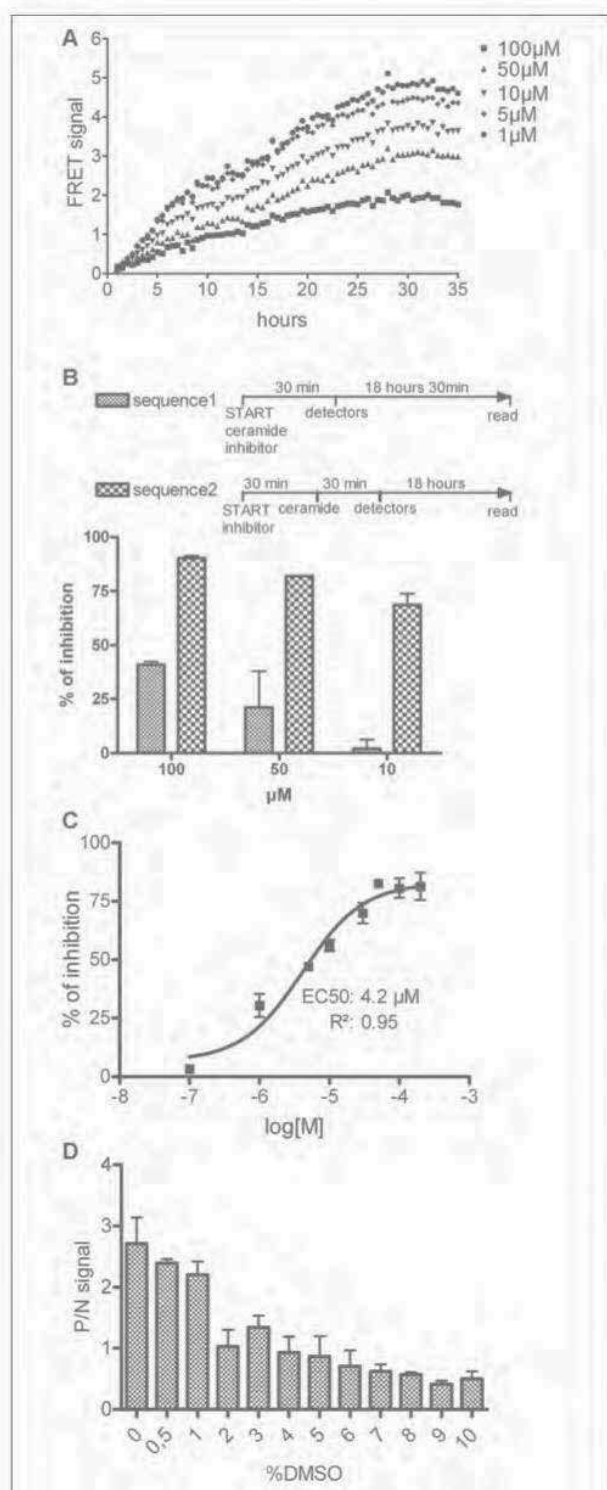


Figure 4. (A) Effect of different concentrations of HPA12 calibrator on the fluorescence resonance energy transfer (FRET) signal kinetic. HPA12 at different concentrations was added to START-Cer's homogeneous time-resolved fluorescence assay, and measurements were taken every 30 min for 35 h. (B) Effect

of sequence addition of reagent to percentage of inhibition of HPA12. Sequence 1: START and Cer were incubated for 30 min, then inhibitor and detectors (monoclonal antibody-labeled europium kryptate and streptavidine-d2) were added. Sequence 2: START was preincubated with inhibitor for 30 min, then Cer was added and incubated for 30 min at 37 °C. After 30 min, detectors were added. Measurements were done at 18 h. (C) Half maximal effective concentration (EC_{50}) of the calibrator HPA12 was defined by the sigmoidal dose-curve response method. (D) Effect of DMSO. The P/N signal at 18 h was represented depending on the percentage of DMSO.

two assays rely on radiometric readouts and require extensive ultracentrifugation steps. Here, we propose an easy HTRF assay to measure the START-Cer interaction.

HTRF assays were developed for many targets such as kinases, G-protein-coupled receptors, protein-protein interactions, protein-DNA interactions, a lot of enzymatic assays (see Degorce et al.¹³ for review), and lipidic molecule detection.³⁰ Here, for the first time, we adapted the HTRF technology to a protein-lipid binding assay suitable for large pharmacological studies and HTS. This specific protein-lipid HTRF binding assay required a long equilibration time and displayed a limited DMSO tolerance. The reagent addition sequence also proved to be determinant. Protein and competitor preincubation was shown to have a strong favorable impact on competitor detection sensibility, probably because of the slow kinetics of the formation of the START-Cer probe complex.¹⁵

We identified molecules with a potential inhibitory effect on the START-Cer interaction. To exclude fluorescent false-positive molecules, the time delay of the readout was extended from 60 μ s to 100 μ s.³¹ We further controlled and validated each hit with an independent assay based on the FLINT protocol, showing the good accuracy level of the HTRF assay. Cer competitors discovered in this work are up to three orders of magnitude more potent than the reference antagonist HPA12. An IC_{50} of 70 nM has been reported for the inhibition of the biosynthetic production of sphingomyelin in a whole living cell system of HPA12. The difference of magnitude between this IC_{50} and the presently measured EC_{50} can be explained considering that the observed phenomenon is entirely distinct (the ligand binding versus the inhibition of a biosynthetic pathway including an ER-to-Golgi transport step and an enzymatic transformation), the protein is not entirely the same (the START domain versus the entire CERT protein), and the experimental medium is also fundamentally different (an *in vitro* assay with a recombinant protein versus a living cell experiment).

Finally, our study paves the way for the development of new series of potential CERT antagonists. Further work is currently under way in our laboratories to elucidate the binding mode and evaluate the effect of the newly identified

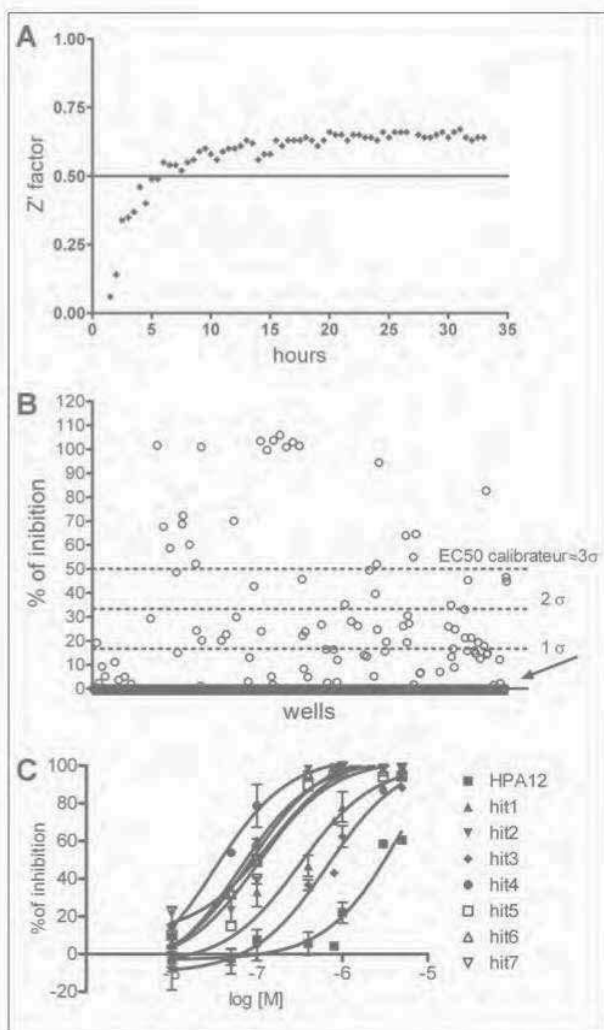


Figure 5. (A) Z' factor evolution. Thirty-two blanks, negatives, and positives controls were measured every 30 min for 35 h. Data handling is detailed in the Materials and Methods section. (B) Screening results of the library of compounds. Plotting of percentages of inhibition of 672 molecules at final concentration of 5 μ M is represented. One, two, or three times of the value of standard deviation (σ) are represented in the graph. (C) Inhibitory effect determination. Sigmoidal doses-curve responses for the seven hits identified are represented.

START domain ligands on the inhibition of the CERT-mediated Cer trafficking. HTRF assay was thus demonstrated to be an effective technology to discover competitors of this lipid-protein interaction.

Acknowledgments

We thank the Research & Development Operational Program funded by the ERDF (ITMS 26220220093) for financial support. The TR-FRET screening experiments were carried out at the "Plateforme Intégrée de Criblage de Toulouse" (PICT, IBISA)

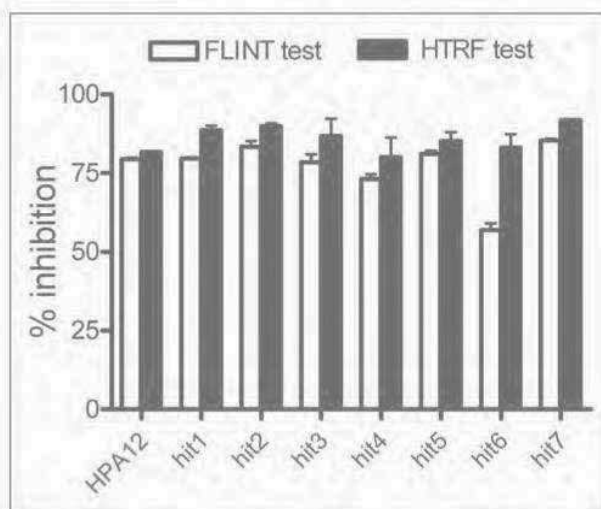


Figure 6. Confirmation of hits. Inhibitory potential of the seven hits discovered with the homogeneous time-resolved fluorescence assays was verified at 5 μ M with the FLINT as described in Figure 2A.

facilities. We are grateful to Professor Adam Daïch and Dr. Dušan Berkeš for a generous gift of HPA12 and analogs.

Declaration of Conflicting Interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: The financial support by CNRS for a "PIR-Therapeutic Innovation" funding, the "Université Paul Sabatier," and the "Agence Nationale de la Recherche" (ANR) (SphingoDR project) are gratefully acknowledged.

References

- Ogretmen, B.; Hannun, Y. A. Biologically Active Sphingolipids in Cancer Pathogenesis and Treatment. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 604–616.
- Peetla, C.; Vijayaraghavalu, S.; Labhasetwar, V. Biophysics of Cell Membrane Lipids in Cancer Drug Resistance: Implications for Drug Transport and Drug Delivery with Nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1686–1698.
- Peetla, C.; Bhawe, R.; Vijayaraghavalu, S.; et al. Drug Resistance in Breast Cancer Cells: Biophysical Characterization of and Doxorubicin Interactions with Membrane Lipids. *Mol. Pharm.* **2010**, *7*, 2334–2348.
- Ramu, A.; Glaubiger, D.; Weintraub, H. Differences in Lipid Composition of Doxorubicin-Sensitive and -Resistant P388 Cells. *Cancer Treat. Rep.* **1984**, *68*, 637–641.
- Morales, A.; Fernandez-Checa, J. C. Pharmacological Modulation of Sphingolipids and Role in Disease and Cancer Cell Biology. *Mini Rev. Med. Chem.* **2007**, *7*, 371–382.

6. Hanada, K.; Kumagai, K.; Yasuda, S.; et al. Molecular Machinery for Non-Vesicular Trafficking of Ceramide. *Nature* **2003**, *426*, 803–809.
7. Scheffer, L.; Raghavendra, P. R.; Ma, J.; et al. Ceramide Transfer Protein and Cancer. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2011**, *11*, 904–910.
8. Lee, A. J.; Roylance, R.; Sander, J.; et al. CERT Depletion Predicts Chemotherapy Benefit and Mediates Cytotoxic and Polyploid-Specific Cancer Cell Death through Autophagy Induction. *J. Pathol.* **2012**, *226*, 482–494.
9. Nakamura, Y.; Matsubara, R.; Kitagawa, H.; et al. Stereoselective Synthesis and Structure-Activity Relationship of Novel Ceramide Trafficking Inhibitors (1R,3R)-N-(3-hydroxy-1-hydroxymethyl-3-phenylpropyl)Dodecanamide and Its Analogues. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3688–3695.
10. Kumagai, K.; Yasuda, S.; Okemoto, K.; et al. CERT Mediates Intermembrane Transfer of Various Molecular Species of Ceramides. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 6488–6495.
11. Combemale, S.; Rodriguez, F.; Garcia, V.; et al. A Biologically Relevant Probe to Assess the Binding of Potential Ligands to the CERT Transfer Protein. *RCS Adv.* **2013**, *3*, 18970–18984.
12. Achard, S.; Jean, A.; Lorphelin, D.; et al. Homogeneous Assays Allow Direct “In Well” Cytokine Level Quantification. *Assay Drug Dev. Technol.* **2003**, *1*(1 pt 2), 181–185.
13. Degorce, F.; Card, A.; Soh, S.; et al. HTRF: A Technology Tailored for Drug Discovery: A Review of Theoretical Aspects and Recent Applications. *Curr. Chem. Genom.* **2009**, *3*, 22–32.
14. Klumpp, M.; Boettcher, A.; Becker, D.; et al. Readout Technologies for Highly Miniaturized Kinase Assays Applicable to High-Throughput Screening in a 1536-Well Format. *J. Biomol. Screen.* **2006**, *11*, 617–633.
15. Dufau, I.; Lazzari, A.; Samson, A.; et al., Optimization of a Homogeneous Assay for Kinase Inhibitors in Plant Extracts. *Assay Drug Dev. Technol.* **2008**, *6*, 673–682.
16. Mishra, K. P.; Ganju, L.; Sairam, M.; et al. A Review of High Throughput Technology for the Screening of Natural Products. *Biomed. Pharmacother.* **2008**, *62*, 94–98.
17. Duris, A.; Wiesenganger, T.; Moravcikova, D.; et al. Expedient and Practical Synthesis of CERT-Dependent Ceramide Trafficking Inhibitor HPA-12 and Its Analogues. *Organ Lett.* **2011**, *13*, 1642–1645.
18. Yasuda, S.; Kitagawa, H.; Ueno, M.; et al. A Novel Inhibitor of Ceramide Trafficking from the Endoplasmic Reticulum to the Site of Sphingomyelin Synthesis. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 43994–44002.
19. Kumagai, K.; Kawano-Kawada, M.; Hanada, K. Phosphoregulation of the Ceramide Transport Protein CERT at Serine 315 in the Interaction with VAMP-Associated Protein (VAP) for Inter-Organellar Trafficking of Ceramide in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 10748–10760.
20. Ueno, M.; Huang, Y. Y.; Yamano, A.; et al. Revised Stereochemistry of Ceramide-Trafficking Inhibitor HPA-12 by X-Ray Crystallography Analysis. *Organ. Lett.* **2013**, *15*, 2869–2871.
21. Zhang, J. H.; Chung, T. D.; Oldenburg, K. R. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J. Biomol. Screen.* **1999**, *4*, 67–73.
22. Ruggiu, F.; Gizzi, P.; Galzi, J. L.; et al. Quantitative Structure-Property Relationship Modeling: A Valuable Support in High-Throughput Screening Quality Control. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 2510–2520.
23. Hanada, K. Intracellular Trafficking of Ceramide by Ceramide Transfer Protein. *Proc. Japan Acad. B Phys. Biol. Sci.* **2010**, *86*, 426–437.
24. Maccarron, R.; Hertzberg, R. P. Design and Implementation of High Throughput Screening Assays. *High Throughput Screen. Methods Protoc.* **2006**, *190*, 1.
25. Copeland, C., Employment-based retirement and pension plan participation: declining levels and geographic differences. *EBRI issue brief / Employee Benefit Research Institute* **2003**, (262), 1–27.
26. Hulme, E. C.; Trevethick, M. A. Ligand Binding Assays at Equilibrium: Validation and Interpretation. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *161*, 1219–1237.
27. Kumagai, K.; Nishijima, M.; Hanada, K. Reconstitution Assay System for Ceramide Transport with Semi-Intact Cells. *Methods Cell Biol.* **2012**, *108*, 117–129.
28. Charruyer, A.; Bell, S. M.; Kawano, M.; et al. Decreased Ceramide Transport Protein (CERT) Function Alters Sphingomyelin Production following UVB Irradiation. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 16682–16692.
29. Sugiki, T.; Takahashi, H.; Nagasu, M.; et al. Real-Time Assay Method of Lipid Extraction Activity. *Anal. Biochem.* **2010**, *399*, 162–167.
30. Bergsdorf, C.; Kropp-Goerke, C.; Kaehler, I.; et al. A One-Day, Dispense-Only IP-One HTRF Assay for High-Throughput Screening of G-protein-Coupled Receptors: Towards Cells as Reagents. *Assay Drug Dev. Technol.* **2008**, *6*, 39–53.
31. Imbert, P. E.; Unterreiner, V.; Siebert, D.; et al. Recommendations for the Reduction of Compound Artifacts in Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer Assays. *Assay Drug Dev. Technol.* **2007**, *5*, 363–372.

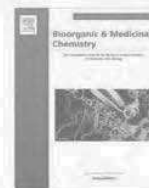
La miniaturisation de cet essai, rendue possible par sa réalisation en phase homogène, permet d'évaluer les ligands sur de larges gammes de concentrations. La détermination des EC_{50} des composés devient alors réalisable.

L'article suivant décrit la première évaluation *in silico* et *in vitro* des quatre stéréoisomères HPA-12, obtenus grâce à une collaboration avec les Pr. Adam Daïch (Unité de Recherche en Chimie Organique et Macromoléculaire, EA3221, FR CNRS 3038, Université du Havre, France) et Dr. Dušan Berkeš (Département de Chimie Organique de l'Université de Technologie Slovaque, Bratislava, Slovaquie).



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

The CERT antagonist HPA-12: First practical synthesis and individual binding evaluation of the four stereoisomers



Cécile Santos^a, Laurence Fleury^b, Frédéric Rodriguez^a, Jozef Markus^c, Dušan Berkeš^{c,*}, Adam Daïch^d, Frédéric Ausseil^b, Cécile Baudoin-Dehoux^a, Stéphanie Ballereau^{a,*}, Yves Génisson^{a,*}

^aSPCMIB, UMR-CNRS 5068, Université Paul Sabatier-Toulouse III, 118, route de Narbonne, F-31062 Toulouse Cedex 9, France

^bUnité de Service et de Recherche CNRS-Pierre Fabre n°3388 ETaC, CRDPF, 3 avenue H. Curien, 31035 Toulouse Cedex 01, France

^cDepartment of Organic Chemistry, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovakia

^dURCOM, EA 3221, INC3M CNRS FR-3038, UFR Sciences & Techniques, University of Le Havre, 25, rue Philippe Lebon, B.P. 540, F-76058 Le Havre Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 January 2015

Revised 2 March 2015

Accepted 5 March 2015

Available online 12 March 2015

Keywords:

Sphingolipid

CERT

CIAT

HPA-12

TR-FRET

ABSTRACT

The first unified synthetic route to the four enantiopure HPA-12 stereoisomers in multi-gram scale is reported based on Crystallization-Induced Asymmetric Transformation (CIAT) technology. This preparative stereoselective synthesis allowed the unprecedented comparative evaluation of HPA-12 stereoisomers regarding their interaction with the CERT START domain. In vitro binding assay coupled to in silico docking approach indicate a possible interaction for the four derivatives. The first TR-FRET homogeneous-phase assay was developed to quantify their binding to the START domain, allowing complete determination of HPA-12 EC₅₀. Results indicate that not only the (1R,3S) lead to the strongest binding, but that both 1R and 3S stereocenters similarly contribute to extent of recognition. This automated homogenous assay further opens up promising prospect for the identification of novel potential CERT antagonist by means of high throughput screening.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Sphingolipids (SLs) are key signaling molecules involved in the apoptotic cellular response. The intracellular availability of ceramide conditions the sensitivity of cancer cells to apoptosis signaling following chemotherapeutic treatment. SLs biosynthesis begins in the endoplasmic reticulum (ER) from where the produced ceramide (Cer) is transferred to the Golgi complex to be functionalized at the primary hydroxyl (Scheme 1).¹ The non-vesicular ceramide trafficking along the *de novo* sphingomyelin (SM) synthesis rely on the CERT (CERamide Transfer) protein (Scheme 1).² In regulating the intracellular Cer content, the CERT activity correlates to the signaling pathways of this pro-apoptotic SL. Drug-resistant cell lines display an increased CERT expression³ and re-sensitization of cancer cells to chemotherapeutic agents was achieved through both genetic and pharmacological CERT inhibition.⁴ Conversely, the cellular response to pro-apoptotic stress involved inactivation and caspase cleavage of this protein.⁵ Increasing intracellular Cer availability in antagonizing its CERT-mediated inter-organelle

trafficking thus represents a promising alternative anticancer approach.⁶

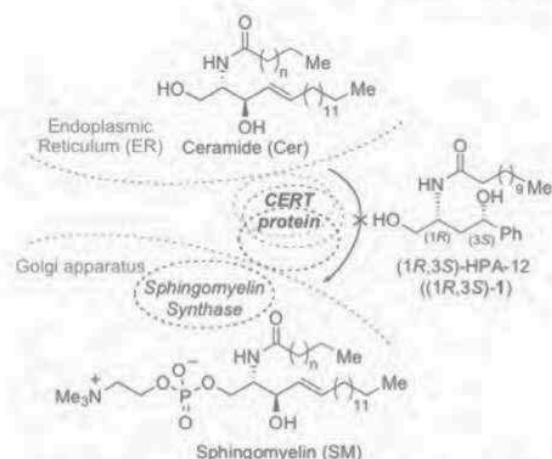
CERT is a cytosolic 68 kDa multi-domain protein.⁷ The N-terminal Pleckstrin homology (PH) domain is responsible for CERT localization to the Golgi.⁸ The middle region contains a serine-rich (SR) motif and an FFAT (diphenylalanine [FF] in an acidic tract) motif targeting the ER membrane.⁹ The C-terminal steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer (START) domain has a long amphiphilic cavity selectively binding D-erythroceramide and is per se responsible for the transport activity of the protein.¹⁰ HPAs (N-(3-hydroxy-1-hydroxymethyl-3-phenylpropyl)alkanamides) constitute the only family of CERT antagonists reported to date (Scheme 1).¹¹

2. Results and discussion

Identification of the dodecanamide derivative HPA-12 as a specific inhibitor of ceramide trafficking was reported in 2001, before the discovery of the CERT-associated non-vesicular ceramide transfer machinery.¹² The (1R,3R) configuration initially assigned to the most potent stereoisomer¹³ was recently revised as (1R,3S) (Scheme 1).¹⁴ Yet, among the two diastereoisomeric HPA pairs, only the (1R*,3R*) pair, corrected lately as (1R*,3S*),¹⁵ was individually prepared and evaluated as inhibitors of *de novo*

* Corresponding authors. Tel.: +33 (0)5 61 55 62 99; fax: +33 (0)5 61 55 60 11 (S.B. and Y.G.).

E-mail addresses: dušan.berkeš@stuba.sk (D. Berkeš), ballereau@chimie.ups-tlse.fr (S. Ballereau), genisson@chimie.ups-tlse.fr (Y. Génisson).



Scheme 1. The CERT-mediated ER-to-Golgi Cer trafficking antagonised by HPA-12 along the *de novo* SM biosynthesis.

SM production in living cells. Thus, in the absence of general and practical synthetic route, no systematic biological evaluation of the HPA stereoisomers was reported.¹⁶ We describe here the first unified preparative synthetic access to the four stereoisomeric forms of HPA-12 and the study of their individual CERT START domain interaction profile.

We recently reported a practical and reliable stereodivergent access to *syn*- and *anti*-diastereomers of 1-substituted 3-aminobutane-1,4-diols as key intermediates of ceramide analogues.^{14a} This route notably led to the revision of the initially reported (1*R*,3*R*)-*anti* stereochemical assignment for HPA-12 to the (1*R*,3*S*)-*syn* configuration.^{14a} Prompted by our preliminary *in vitro/in silico* protein interaction study of CERT ligands,¹⁷ we described here an in-depth optimization of this route demonstrating the effectiveness of Crystallisation-Induced Asymmetric Transformations (CIATs)¹⁸ in delivering multi-gram quantities of all four stereoisomers of HPA-12.

The synthetic sequence, starting from the commercially available benzoylacrylic acid, uses 1-phenylethylamine (α -PEA) as a chiral inductor (Scheme 2). Under optimized conditions, the CIAT was successfully implemented for the synthesis of oxoaminoacids **3** and **ent-3** in a 40 g-scale (step a), Scheme 2). The use of a Mn(II)-catalysed oxoamino acid reduction followed by a DCC-mediated lactonisation (step b), Scheme 2) provided the corresponding enantiopure *trans*-butano-4-lactone **4** and **ent-4**.²⁰ From the same oxoaminoacids **3** and **ent-3**, the acid-catalysed lactonisation of the mixture of *syn*- and *anti*- γ -aryl- γ -hydroxy- α -amino acids, via a second CIAT process (step c), Scheme 2), produced *cis*-butano-4-lactones **5** and **ent-5** in high yield and diastereoselectivity.²¹ Both lactones were converted to the *syn*- and *anti*-HPA-12 derivatives via lactone reduction, N-debenzylation and acylation (steps d–f), Scheme 2).^{14a}

Overall, starting from 7 g of (*E*)-4-oxo-4-phenylbut-2-enoic acid (**2**), yielding 10 g of the corresponding oxoamino acids **3** (**3** and **ent-3**), the stereodivergent synthesis of both *syn*- and *anti*-HPA-12 and their enantiomers produced ca. 5 g of optically pure sample of the four stereoisomers of HPA-12 (**1**) (see ESI for chiral HPLC analysis).

Straightforward assessment of the protein recognition by a CERT antagonist can be achieved using a fluorescent ceramide probe-based *in vitro* binding assay.²² We recently developed such a procedure with the START domain²³ that was later on adapted by Arenz and co-workers, with the CERT protein.¹⁶ This type of assay, relying on the immobilization of a histidine-tagged protein on a

metal affinity resin, presents the advantage of being robust and reliable. We also demonstrated that it could be used, in conjunction with molecular modelling, for the identification of new CERT ligands.¹⁷

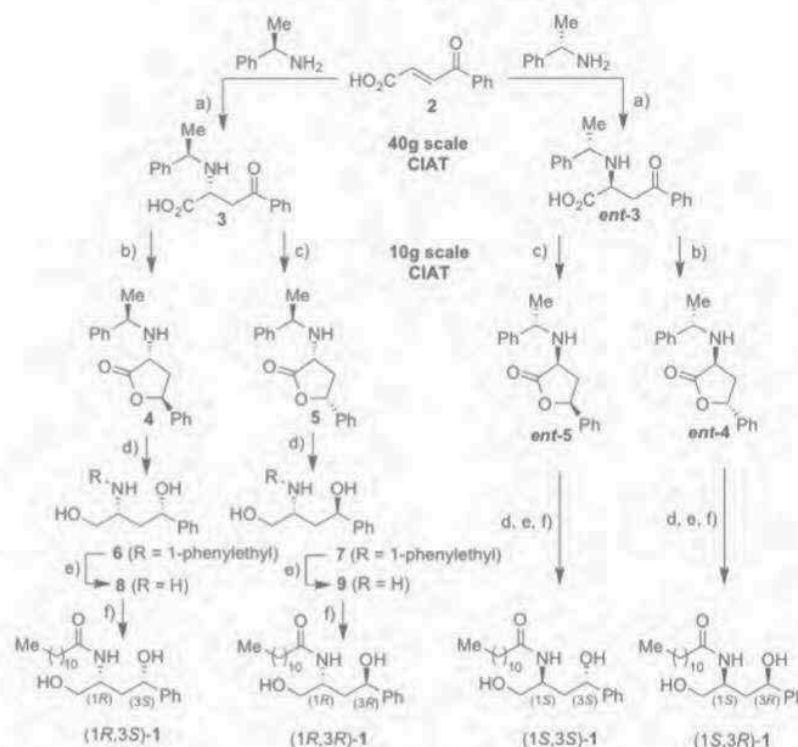
We applied this approach to the comparative evaluation of the four HPA-12 stereoisomers. The extent of CERT START domain binding is correlated to the diminution of fluorescence in the fraction of the ceramide probe bound to the protein, compared to the control value in the absence competitor. A similar degree of protein recognition was recorded for all stereoisomeric forms of HPA-12 (Table 1). Both 1*R* derivatives, presenting a configuration for the dodecanamide moiety related to that of Cer, displayed a slightly stronger binding with a 62–68% loss of fluorescence. A 57–66% decrease in fluorescence was on the other hand recorded for the two 1*S* stereoisomers of HPA-12.

We turned to molecular docking experiments to substantiate the observed protein binding profile. The developed¹⁷ *in silico* procedure, based on Molegro Virtual Docker software²⁴ was applied to HPA-12 stereoisomers, extended to new scoring scheme and template models (see ESI). The (1*R*,3*R*) and (1*R*,3*S*) isomers gave comparable calculated complexes.¹⁷ A convergent interaction trend was observed for the two 1*S* stereoisomers. The four HPA-12 stereoisomers were thus found to fit into the START cavity in an overall disposition reminiscent to that of the Cer natural ligand (see ESI, Fig. 7A–D).

A relevant set of hydrogen bonds with the surrounding aminoacids residues, analogous to that found with the native Cer ligand, was identified in each calculated complexes.²⁵ The alkanamide moiety interacts with Glu446 (for the NH fragment) and Tyr553 (for the carbonyl). The 3-hydroxy-1-hydroxymethyl-3-phenylpropyl backbone develops hydrogen bonds with Arg442, Gln467, and additionally Tyr482 (for the primary hydroxyl group), as well as Asn504 (for the secondary alcohol) (Fig. 1A–D). The most affine (1*R*,3*S*) isomer gives rise to an optimum set of hydrogen bonds (Fig. 1B) while its enantiomer, displaying the weakest binding, showed the poorest hydrogen bond pattern (Fig. 1C), lacking interaction with Asn504 and Tyr482. However, after analysis of a set of docking scores, calculated complexes of all four compounds were found of comparable energy (see ESI, Table 2), indicating that the START domain may recognize each HPA stereoisomer. These results were concordant with the binding data (Table 1). The relatively large binding cavity of START appears indeed sufficiently adaptable to accommodate all four stereoisomers of the flexible HPA-12 aliphatic backbone.

The difference between these START protein interaction data and the relative cellular CERT-mediated Cer trafficking inhibition profile reported for some HPA stereoisomers (no individual inter-vesicular extraction/transport inhibitory assay led to the comparison of each of the four isomers)^{12a,22} suggests that this combined binding/docking approach does not allow to sufficiently discriminate these ligands on the unique basis of their stereochemistry. In addition, the heterogeneous binding test used so far suffers from its limited throughput and the rather important protein amounts required, both rendering any extensive dose–effect studies cumbersome and expensive. We thus sought for a more practical and sensitive CERT binding assay that could eventually be amenable to miniaturization and automation.

We focused on the TR-FRET (Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer). FRET technology is based on the transfer of energy between two fluorophores, a donor and an acceptor, when in close proximity (from 50 to 90 Å). Because of these spectral properties, a donor–acceptor complex can be detected by FRET without the need for physical separation from the unbound partners. Thus, TR-FRET is a homogeneous assay method that does not require any separation step such as centrifuging, washing,



Scheme 2. Crystallisation Induced Asymmetric Transformation- or CIAT-based synthesis of the four HPA-12 stereoisomers. Reagents and conditions: (a) MeOH, 25–30 °C, 7d, CIAT, 89% yield in **3** (dr 99:1), 88% yield in **ent-3** (dr >98:2); (b) (i) NaBH₄, MnCl₂·4H₂O (cat.), MeOH, 0–5 °C (dr 97:3); (ii) DCC, TEA, THF, rt, 68% yield in **4** (dr 97:3), 69% yield in **ent-4** (dr 97:3); (c) (i) NaBH₄, MeOH, rt (dr 2:1); (ii) 8 M HCl, 60 °C, CIAT, 85% yield in **5** (dr 98:2), 83% yield in **ent-5** (dr 98:2); (d) NaBH₄, EtOH, rt, 85% yield in **6** (dr 99 > 1), 84% yield in **ent-6** (dr 99 > 1), 88% yield in **7** (dr 98:2), 85% yield in **ent-7** (dr 98:2); (e) H₂, Pd/C, AcOH (2 equiv), MeOH, 95% yield in **8** (dr 97:3), 96% yield in **ent-8** (dr 97:3), 95% yield in **9** (dr 98:2), 95% yield in **ent-9** (dr 98:2); (f) C₁₁H₂₃COCl, DIPEA, THF, 0 °C, 72% yield in (1R,3S)-**syn-1** (dr >99:1), 72% yield in (1S,3R)-**syn-1** (dr 99:1), 70% yield in (1R,3R)-**anti-1** (dr 99:1), 75% yield in (1S,3S)-**syn-1** (dr 99:1). Global yields from **3**: 40% in (1R,3S)-**syn-1** and (1S,3R)-**syn-1** (>4.4 g from 10 g of **3**); global yields from **ent-3**: 50% in (1R,3R)-**anti-1** and (1S,3S)-**anti-1** (>5.1 g from 10 g of **ent-3**).

Table 1
Fluorescence binding assays of the four HPA-12 stereoisomers

Competitor	(1R,3R)- HPA-12	(1R,3S)- HPA-12	(1S,3R)- HPA-12	(1S,3S)- HPA-12
Fluorescence (% of control) ^a	38%	32%	43%	34%

^a Residual fluorescence of the ceramide probe in the fraction bound to the protein in the presence of each HPA-12 stereoisomers compared to the control experiment without competitor. See Supporting information for experimental procedure.

filtration, or magnetic partitioning. The background fluorescence (from sample components such as buffers, proteins) is extremely transient (with a lifetime in the nanosecond range) and can therefore be eliminated using time-resolved methodologies (with a 50–150 μs delay between the excitation and fluorescence measurement).

Our approach is based on a specially designed ω-biotinylated Cer probe²³ in combination with histidine-tagged CERT START domain (Fig. 2). Structural study of the protein–ligand complexes shows that the terminus of the sphingosine backbone gets out of the START cavity for Cer bearing amide chain longer than C16.²⁶ It was thus conceived that streptavidin could recognize the biotin fragment of the bound probe, allowing assemblage of the FRET partners.

Detection of the Cer probe–START domain complex relies on TR-FRET between an Europium cryptate linked to an anti-Histidine antibody, as the fluorescence donor, and a d2-streptavidin conjugate, as the acceptor. Displacement of the ω-biotinylated Cer probe at the START binding site by a competitor led to dissociation of the

complex and extinction of the TR-FRET signal. Due to the time-resolved mode, the spectral and temporal selectivity of this assay eliminates false positive and ensures a highly specific signal. Furthermore, the absence of separation step allows automation and the use of small volumes ensures a high level of miniaturization.

In practice, His-tagged recombinant START domain of CERT protein (1 equiv) was first pre-incubated with each HPA stereoisomer at various concentrations. The ω-biotinylated Cer probe (1 equiv) was then added followed by d2-streptavidin conjugate and Europium cryptate-labeled monoclonal anti-histidine antibody. After 18 h of incubation at room temperature, the time-resolved fluorescence was measured at 590 nm.

This homogenous TR-FRET binding assay to the CERT START domain allowed facile measurement of the EC₅₀ of the four stereoisomers of HPA-12 (Fig. 3). All compounds competed, to various extents, with the biotinylated ceramide probe for the binding to the START domain. The higher EC₅₀ (159 μM) was found for the (1S,3R)-HPA-12, in convergence with the binding data (Table 1). Both (1R,3R) and (1S,3S) isomers displayed fair binding to the START domain with an EC₅₀ of 22 and 25 μM, respectively. As proposed previously, the (1R,3S)-HPA-12, possessing an EC₅₀ of 4 μM, proved to be the most affine stereoisomer. These data, concordant with an interaction of all four HPA-12 stereoisomers with the protein noted earlier (vide supra), allowed for the first time their discrimination regarding CERT START domain binding. Notably, they indicate that retaining either 1R or 3S configuration warrant a good level of recognition, while inversion of both stereocenters led to a substantial loss of affinity for the (1S,3R) isomer.

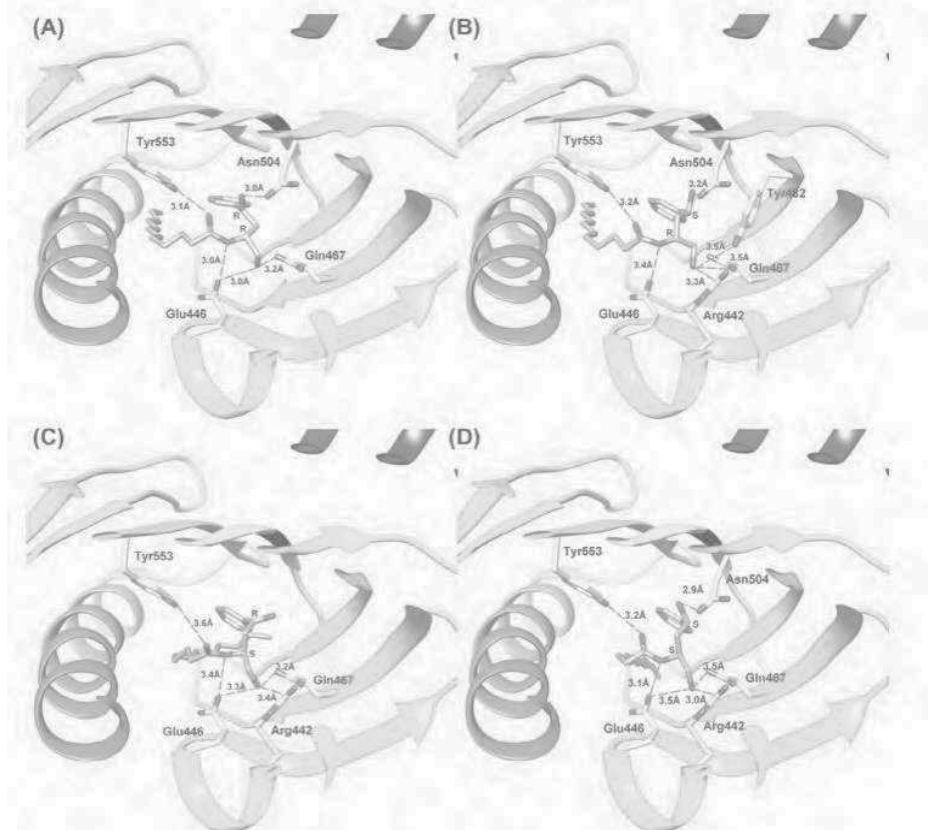


Figure 1. Hydrogen-bond networks around one (typical) pose per compound, in the case of (A) (1R,3R)-HPA-12, (B) (1R,3S)-HPA-12, (C) (1S,3R)-HPA-12 and (D) (1S,3S)-HPA-12.

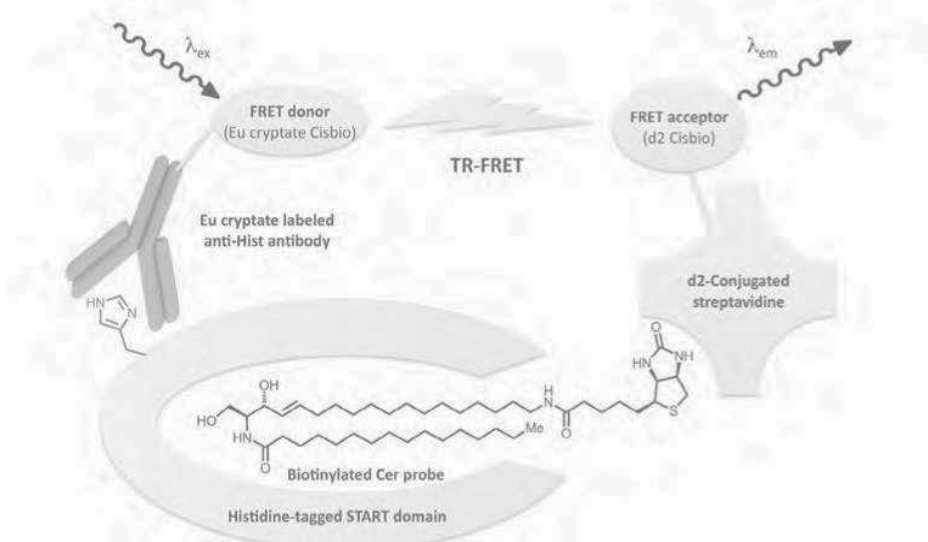


Figure 2. Schematic view of the homogenous TR-FRET binding assay to the CERT START domain.

3. Conclusion

In conclusion, we described the first unified large-scale stereocontrolled synthesis of the four diastereoisomers of HPA-12. Application of an *in vitro/in silico* CERT START domain binding evaluation indicated that the four stereoisomers of these flexible

molecules could be recognized by the large protein binding cavity, the 1R ceramide-like configuration being more favourable. A more practical and sensitive binding assay was developed based on a specially designed ω -biotinylated Cer probe, representing the first application of the homogenous TR-FRET to the CERT START domain. This procedure allowed unprecedented assessment of

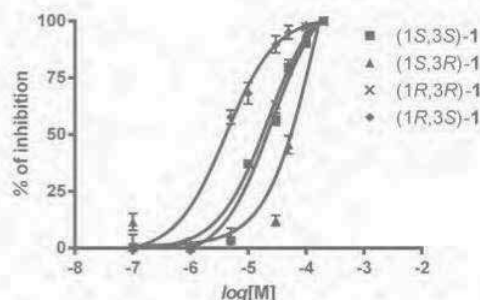


Figure 3. Dose–response curves for the four stereoisomers of HPA-12. Curve fit of sigmoidal dose–response curves performed with Prism 3.0 (Graphpad Software, San Diego, CA) allowed determination of the EC_{50} for each stereoisomers. EC_{50} of HPA-12: 159 μ M for (1S,3R); 25 μ M for (1S,3S); 22 μ M for (1R,3R) and 4 μ M for (1R,3S).

the four HPA-12 stereoisomers binding EC_{50} . The more affine compound possesses the (1R,3S) configuration, in concordance with the Cer trafficking inhibitory profile previously reported in living cells experiments.^{12a,15} Furthermore, these binding data indicate that the configuration of both 1R and 3S stereocenters similarly contribute to extent of protein recognition. The miniaturized and automated version of this homogenous TR-FRET assay proved to be fully adapted to HTS,²⁷ opening up new prospect for the systematic exploration of novel CERT antagonists as Cer trafficking inhibitors with emerging therapeutic potential.²⁸

4. Experimental part

4.1. Synthesis

4.1.1. (1R,3S)-N-(3-Hydroxy-1-hydroxymethyl-3-phenylprop-1-yl)dodecanamide (1R,3S)-1 or (1S,3R)-1

Corresponding syn-aminodiol **8** (3.07 g, 0.0169 mol) or *ent*-**8** (3.20 g, 0.0176 mol) and DIPEA (1.5 equiv, 3.28 g, 0.0254 mol) were dissolved in THF (100 mL) under heating and chilled to 0 °C. To this mixture the solution of lauroyl chloride (1.1 equiv, 4.08 g, 0.0186 mol) in THF (15 mL) was added dropwise during 15 min at 0 °C. The 0.5 M NaOH solution (70 mL) was added to the reaction mixture and THF was evaporated. Remained suspension was extracted with dichloromethane (3 \times 100 mL), combined organic layers were dried over $MgSO_4$ and evaporated. The obtained crude product was crystallized from the diethyl ether/hexane mixture to give 3.6 g of (1R,3S)-**1** or 3.8 g of (1S,3R)-**1**. The filtrate was evaporated and the residue was further purified by silica gel flash chromatography using $Et_2O \rightarrow Et_2O/MeOH$ 15:1 solvent system to obtain second portion (0.81 g) of pure (1R,3S)-**1**. Combined yield of (1R,3S)-N-(3-hydroxy-1-hydroxymethyl-3-phenylprop-1-yl)dodecanamide (1R,3S)-**1** was 4.42 g (72%), dr >99:1, er 99.7:0.3, mp 89–91 °C (lit.^{15a} 81–82 °C), $[\alpha]_D = -39.2$ (c 0.5, $CHCl_3$) [lit.^{15a} $[\alpha]_D = -34.4$ (c 0.36, $CHCl_3$)]. In the case of its enantiomer (1S,3R)-**1**, 4.60 g (72%), dr 99:1, er 99.3:0.7, mp 87–89 °C, $[\alpha]_D = +38.5$ (c 0.5, $CHCl_3$) was obtained. The NMR spectra are in agreement with the reported spectra.^{14a}

4.1.2. (1R,3R)-N-(3-Hydroxy-1-hydroxymethyl-3-phenylprop-1-yl)dodecanamide (1R,3R)-1 or (1S,3S)-1

Starting from the *anti*-aminobutanediols **9** (3.68 g, 0.0203 mol) or *ent*-**9** (3.80 g, 0.0209 mol) and following the above described procedure the corresponding HPA-12 (1R,3R)-**1** (5.17 g, 70%), dr 99:1, er 99.9:0.1, mp 64–66 °C (lit.^{15a} 53–55 °C), $[\alpha]_D = +10.2$ (c 0.5, $CHCl_3$) [lit.^{15a} $[\alpha]_D = +10.5$ (c 0.44, $CHCl_3$)] and *ent*-HPA-12 (1S,3S)-**1** (5.70 g, 75%), dr 99:1, er 99.9:0.1, mp 65–68 °C, $[\alpha]_D = -10.5$ (c 0.5, $CHCl_3$) were obtained as white solids. The NMR spectra are in agreement with the reported spectra.^{14a}

4.2. Binding assays

4.2.1. Materials

Human COL4A3ABP recombinant histidine-tagged protein fragment (START) (Product #ab95897) was obtained from Abcam. TALON[®] metal affinity resin was from Clontech. Fluorescence spectra were recorded with a Carey Eclipse spectrofluorometer equipped with a xenon lamp source and a Hamamatsu R928 photomultiplier tube. Fluorescent ceramide probe (*N*-((2S,3R,E)-1,3-dihydroxy-18-((7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-yl)amino)octadec-4-en-2-yl)palmitamide) was synthesized according to Ref. 23.

4.2.2. Fluorescence binding assays

The His-tagged recombinant START domain of CERT protein (200 pmol, 6.5 mg, 13 μ L of 0.5 mg/mL commercial solution) was dissolved in TBS (46 μ L) in an Eppendorf tube. The HPA-12 stereoisomer (200 pmol, 2 μ L of 0.1 mM ethanolic solution) and TBS (30 μ L) was added to the tube and the mixture was incubated at 37 °C for 30 min. An equimolar amount of fluorescent ceramide probe (200 pmol, 2 μ L of 0.1 mM ethanolic solution) was then added and after 30 min of incubation, the resulting complex was retained on a TALON[®] metal affinity resin (40 μ L of 50% (v/v) pre-equilibrated with wash buffer), and incubated for 10 min at room temperature with rotary shaking. After centrifugation (14,000 rpm, 30 s), the supernatant was collected as the 'free fraction'. For washing, the resin was suspended in a 10 mM imidazole solution in TBS (75 μ L), and after centrifugation (14,000 rpm, 30 s); the supernatant was collected as the 'wash fraction 1'. This washing step was repeated to give the 'wash fraction 2'. To liberate the protein bound fraction to the TALON[®] resin, the resin was suspended in a 250 mM imidazole solution in TBS (75 μ L) and incubated for 5 min at room temperature. After centrifugation (14,000 rpm, 30 s), the supernatant was collected as the 'bound fraction'. A solution of chloroform/methanol (1:2 (v/v), 3.75-fold volume of each fraction) was then added to each collected fraction. Finally, to retrieve residual fluorophores non-specifically bound to the resin in the tube, TBS (85 μ L) and chloroform/methanol (1:2 (v/v), 375 μ L) were added to the resin in the tube, mixed, and centrifuged (14,000 rpm, 30 s). The supernatant was collected as the 'residual fraction'. For each fraction, the fluorescence was quantified with a Cary Eclipse spectrofluorimeter (NBD: excitation at 465 nm, emission at 530 nm).

Ratio between the fluorescence intensity of this 'bound fraction' and that of gathered washing fractions ('unbound fraction') allows quantification of the probe binding to the START domain of CERT. Probe shifting results in a reduction of fluorescence intensity in this 'bound fraction' in comparison to a blank experiment without competitor and compound binding was quantified by this percentage of fluorescence diminution.

4.2.3. TR-FRET binding assay

4.2.3.1. Materials. Streptavidin-d2 conjugate (Product #610SADLA) and Europium cryptate-labeled anti-Histidine monoclonal antibody (Product #61HISKLA) were obtained from Cisbio Bioassays[®] (Codolet, France). Human COL4A3ABP recombinant histidine-tagged protein fragment (START) (Product #ab95897) was obtained from Abcam. Biotinylated ceramide probe (BioCer, or *N*-((2S,3R,E)-1,3-dihydroxy-18-(5-(2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl) pentanamido)octadec-4-en-2-yl)palmitamide) was synthesized according to Ref. 23.

4.2.3.2. HTRF assay. 8 μ L of 5% of DMSO or compounds and a 1 μ M solution containing the START were incubated 30 min at 37 °C. 2 μ L of 1 μ M Biotinylated ceramide solution was added in 384 Well Low Volume White Round Bottom Polystyrene NBS[™]

Microplate (Product #3673 from Corning®). After 30 min to 37 °C streptavidin-d2 and monoclonal anti-hist antibody labelled with Europium cryptate were added in detection buffer as recommended by manufacturer. After 15 h of incubation at room temperature, the time-resolved fluorescence was measured using an Envision® plate reader (Perkin Elmer; λ_{ex} = 320 nm, λ_{em} = 590 and 665 nm; 60 μ s delay time). The donor fluorescence emission was measured at 590 nm instead of 620 nm in accordance with Envision apparatus and Cisbio recommendation. The HTRF readout was calculated as two wavelengths signal ratio: (665 nm/590 nm) \times 10⁴. FRET signal was defined as (HTRF compound ratio – HTRF negative ratio)/HTRF blank ratio. HTRF negative ratio was (665 nm/590 nm) \times 10⁴ of well containing streptavidin-d2 and anti-Hist monoclonal antibody labelled with Europium cryptate. HTRF blank ratio was (665 nm/590 nm) \times 10⁴ of well containing anti-Hist monoclonal antibody labelled with Europium cryptate.

4.2.3.3. Data handling. Positive FRET signals were performed by dispensing DMSO 5%, so no inhibition of interaction was done. This maximal signal value obtained was set to 0% inhibition.

Percentage of inhibition was calculated using Eq. 1: % inhib. = 100 – (100 * FRET' signal compound) \times FRET signal without compound ratio. The Z' factor was calculated according to Zhang et al.²⁹ with at least 32 assays for each control:

$$Z' = 1 - \frac{(3SD \text{ positive control} + 3SD \text{ negative control})}{(\text{mean positive control} - \text{mean negative control})}$$

All curves fits of sigmoidal dose–response curves were performed with Prism 3.0 (Graphpad Software, San Diego, CA).

Acknowledgments

Financial support by CNRS ('PIR-Therapeutic Innovation'), 'Université Paul Sabatier' and the 'Agence National de la Recherche' (SphingoDR) are gratefully acknowledged. We also thank the Research & Development Operational Program funded by the ERDF (ITMS 26220220093) for financial support. The TR-FRET experiments were carried out on the 'Plateforme Intégrée de Criblage de Toulouse' (PICT, IBISA) facilities.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2015.03.019>.

References and notes

1. Futerman, H. *BBA-Biomembranes* **2006**, *1758*, 1885.
2. (a) Hanada, K.; Kumagai, K.; Yasuda, S.; Miura, Y.; Kawano, M.; Fukasawa, M.; Nishijima, M. *Nature* **2003**, *426*, 803; (b) Yamaji, T.; Kumagai, K.; Tomishige, N.; Hanada, K. *IUBMB Life* **2008**, *60*, 511; (c) Prinz, W. A. *Cell* **2010**, *143*, 870; Wijesinghe, D. S.; Allegood, J. C.; Gentile, L. B.; Fox, T. E.; Kester, M.; Chalfant, C. E. *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 641.
3. Swanton, C.; Marani, M.; Pardo, O.; Warne, P. H.; Kelly, G.; Sahai, E.; Elustondo, F.; Chang, J.; Temple, J.; Ahmed, A. A.; Brenton, J. D.; Downward, J.; Nicke, B. *Cancer Cell* **2007**, *11*, 498.
4. Lee, A. J.; Roylance, R.; Sander, J.; Gorman, P.; Endesfelder, D.; Kschischo, M.; Jones, N. P.; East, P.; Nicke, B.; Spassieva, S.; Obaid, L. M.; Birkbak, N. J.; Szallasi, Z.; McKnight, N. C.; Rowan, A. J.; Speirs, V.; Hanby, A. M.; Downward, J.; Toozé, S. A.; Swanton, C. *J. Pathol.* **2012**, *226*, 482.
5. (a) Charruyer, A.; Bell, S. M.; Kawano, M.; Douangpanya, S.; Yen, T. Y.; Macher, B. A.; Kumagai, K.; Hanada, K.; Holleran, W. M.; Uchida, Y. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 16682; (b) Chandran, S.; Machamer, C. E. *Biochem. J.* **2012**, *442*, 391.
6. Scheffer, L.; Raghavendra, P. R.; Ma, J. J.; Acharya, J. K. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2011**, *11*, 904.
7. Hanada, K.; Kumagai, K.; Tomishige, N.; Kawano, M. *BBA* **2007**, *1771*, 644.
8. Sugiki, T.; Takeuchi, K.; Yamaji, T.; Takano, T.; Tokunaga, Y.; Kumagai, K.; Hanada, K.; Takahashi, H.; Shimada, I. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 33706.
9. Kawano, M.; Kumagai, K.; Nishijima, M.; Hanada, K. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 30279.
10. Thorsell, A. G.; Lee, W. H.; Persson, C.; Siponen, M. I.; Nilsson, M.; Busam, R. D.; Kotenyo, T.; Schuler, H.; Lehtio, L. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e19521.
11. Inhibitors of the SM synthesis preventing CERT-dependent ceramide extraction from ER were also described: Hulin-Matsuda, F.; Tomishige, N.; Sakai, S.; Ishitsuka, R.; Ishii, K.; Makino, A.; Greimel, P.; Abe, M.; Laviad, E. L.; Lagarde, M.; Vidal, H.; Saito, T.; Osada, H.; Hanada, K.; Futerman, A. H.; Kobayashi, T. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 24397.
12. (a) Yasuda, S.; Kitagawa, H.; Ueno, M.; Ishitani, H.; Fukasawa, M.; Nishijima, M.; Kobayashi, S.; Hanada, K. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 43994; (b) Ueno, M.; Kitagawa, H.; Ishitani, H.; Yasuda, S.; Hanada, K.; Kobayashi, S. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7863.
13. Nakamura, Y.; Matsubara, R.; Kitagawa, H.; Kobayashi, S.; Kumagai, K.; Yasuda, S.; Hanada, K. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3688.
14. (a) Duriš, A.; Wiesenganger, T.; Moravčíková, D.; Baran, P.; Kožíšek, J.; Daich, A.; Berkeš, D. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1642; (b) Ueno, M.; Huang, Y. Y.; Yamano, A.; Kobayashi, S. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2869.
15. Yasuda, S.; Kitagawa, H.; Ueno, M.; Ishitani, H.; Fukasawa, M.; Nishijima, M.; Kobayashi, S.; Hanada, K. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 24162. Correction of Ref. 12a.
16. During the course of this study, the synthesis and comparative evaluation of the (1*R*,3*R*)- and (1*R*,3*S*)-HPA-12 regarding their binding to CERT was reported: Saied, E. M.; Diederich, S.; Arenz, C. *Chem. Asian J.* **2014**, *9*, 2092.
17. Santos, C.; Rodriguez, F.; Garcia, V.; Berkeš, D.; Daich, A.; Levade, T.; Baudoin-Dehoux, C.; Ballereau, S.; Génisson, Y. *ChemBioChem* **2014**, *14*, 2522.
18. For reviews on CIAT, see: (a) Ryuzui, Y. *Top. Curr. Chem.* **2007**, *269*, 83; (b) Brands, K. M. J.; Davies, A. J. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2711; (c) Anderson, N. G. *Org. Process Res. Dev.* **2005**, *9*, 800.
19. (a) Kolarovič, A.; Berkeš, D.; Baran, P.; Považanec, F. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2579; (b) Yamada, M.; Nagashima, N.; Hasegawa, J.; Takahashi, S. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 9019.
20. Jakubec, P.; Berkeš, D.; Kolarovič, A.; Považanec, F. *Synthesis* **2006**, 4032.
21. Berkeš, D.; Kolarovič, A.; Manduch, R.; Baran, P.; Považanec, F. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 1927.
22. Kumagai, K.; Yasuda, S.; Okemoto, K.; Nishijima, M.; Kobayashi, S.; Hanada, K. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 6488.
23. Combemale, S.; Santos, C.; Rodriguez, F.; Garcia, V.; Galaup, C.; Frongia, C.; Lobjois, V.; Levade, T.; Baudoin-Dehoux, C.; Ballereau, S.; Génisson, Y. *RCS Adv.* **2013**, *3*, 18970.
24. Thomsen, R.; Christensen, M. H. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 315.
25. We showed in Ref. 17 that molecular docking finely reproduced the hydrogen bond network found in the co-crystal structure of HPA-13 and the CERT START domain: Kudo, N.; Kumagai, K.; Matsubara, R.; Kobayashi, S.; Hanada, K.; Wakatsuki, S.; Kato, R. *J. Mol. Biol.* **2010**, *396*, 245.
26. Kudo, N.; Kumagai, K.; Tomishige, N.; Yamaji, T.; Wakatsuki, S.; Nishijima, M.; Hanada, K.; Kato, R. *PNAS* **2008**, *105*, 488.
27. Fleury, F.; Faux, C.; Santos, C.; Ballereau, S.; Génisson, Y.; Ausseil, F. *J. Biomol. Screen.* **2015**, <http://dx.doi.org/10.1177/1087057115573402>, in press.
28. (a) Derré, I.; Swiss, R.; Agaisse, H. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1002092; (b) Elwell, C. A.; Jiang, S. B.; Kim, J. H.; Lee, A.; Wittmann, T.; Hanada, K.; Melancon, P.; Engel, J. N. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1002198.
29. Zhang, J. H.; Chung, T. D.; Oldenburg, K. R. *J. Biomol. Screen.* **1999**, *4*, 67.

La modélisation des HPA-12 par la méthode *in silico* précédemment développée indique que l'ensemble des stéréoisomères s'arrime correctement au site de liaison du domaine START. La détermination des EC₅₀ de ces composés, réalisée par le Dr. Laurence Fleury, montre d'une part, que le (1*R*,3*S*)-HPA-12 est le plus affiné pour la protéine et d'autre part, que la configuration de chacun des stéréocentres contribuent de façon équivalente au degré de liaison à la protéine.

2) Conception rationnelle *in silico* et relation structure-activité

Lors de cette conception raisonnée de nouveaux ligands de START, nous nous sommes concentrés sur deux familles de composés : les HPAs, dont les structures co-cristallisées offraient une base de travail expérimentale, et les iminosucres, que le criblage virtuel indiquait comme prometteurs. Différents analogues dérivant de ces deux familles ont été conçus *in silico*, modélisés dans la cavité du domaine START, puis, lorsque les composés étaient accessibles (par synthèse au laboratoire ou via une collaboration), évalués *in vitro* par le test de liaison au domaine START. La liaison de ces composés a été évaluée par test FLINT ainsi que TR-FRET, dans le cas de molécules non protonables. Lorsque les composés sont protonables, tels que les iminosucres, leur interaction avec le domaine START est en effet limitée dans les conditions du test TR-FRET puisque le pH optimal du test est de 8,5. Les iminosucres ont ainsi été évalués uniquement sous leur forme protonée par le test FLINT.

a) Famille des HPAs

Le motif structural type des HPAs se caractérise notamment par la présence d'un squelette sphingoïde tronqué se terminant par un noyau phényle. Une optimisation possible de leur structure réside dans l'introduction de substituants aliphatiques visant à rétablir les interactions avec les parois hydrophobes de la cavité du domaine START contribuant à la liaison du ligand naturel Cer. Dans cette optique, cinq classes d'analogues d'HPA-12 ont été modélisées. Parmi ces composés, on retrouve les quatre formes stéréoisomériques des HPAs (type I, II, IV et V) avec la présence d'un cycle aromatique, substitué ou non en position *para* (A) ou en *méta* (B) par des chaînes aliphatiques, ainsi que des analogues sans cycle aromatique, à squelette de type 3-désoxy-phytoCer (C). Des analogues d'HPA-12 à conformation restreinte, de type carbamates cycliques (type III), ont aussi été introduits. Au total, 23 molécules ont été évaluées *in silico* et synthétisées dans le laboratoire du Dr. Dušan Berkeš. La liaison de ces analogues au domaine START a ensuite été déterminée par les tests *in vitro* FLINT et/ou TR-FRET. L'ensemble des résultats est reporté dans le Tableau 18.

L'analyse des scores et des poses calculées retenues indique que la quasi-totalité des analogues HPAs sont reconnus par le domaine START. En revanche, les descripteurs *LE1* et *LE3* et l'analyse des poses ne permettent pas, à eux seuls, de comparer l'interaction des ligands reconnus par START sur cette série, probablement du fait de la grande proximité structurale des composés. Néanmoins, une tendance nette se dégage de l'analyse des scores : les composés de type II, de configuration (1*R*,3*S*), sont les mieux reconnus de cette série et les analogues cyclisés de type III sont les moins reconnus.

Les données de liaison *in vitro* suivent la même tendance, bien que les résultats obtenus par le test FLINT ne soient pas comparables aux résultats obtenus par le test TR-FRET. En effet, le test FLINT n'évalue l'interaction ligand-protéine qu'à une seule concentration avec une incubation de 10 minutes, à 37°C et à pH physiologique. Le test TR-FRET mesure quant à lui une EC₅₀ (à partir de données d'interaction à différentes concentrations) avec 18 heures d'incubation, à température ambiante et à pH=8,5. Ainsi, ces différences de conditions pourraient expliquer la plus faible discrimination observée dans le test FLINT (peu de distinction entre L101, L109, L122 et L123, les quatre stéréoisomères de l'HPA-12), contrairement au test TR-FRET. Ainsi, à l'exception des HPAs cyclique de type III, l'ensemble des analogues présentent une liaison forte à modérée avec le domaine START (liaison résiduelle de la sonde fluorescente inférieure à 50% du contrôle sur le test

FLINT). Les composés HPAs de type II, de configuration (1*R*,3*S*), sont les mieux reconnus de cette série, avec des EC₅₀ de l'ordre de la dizaine de nanomolaire, voire du nanomolaire.

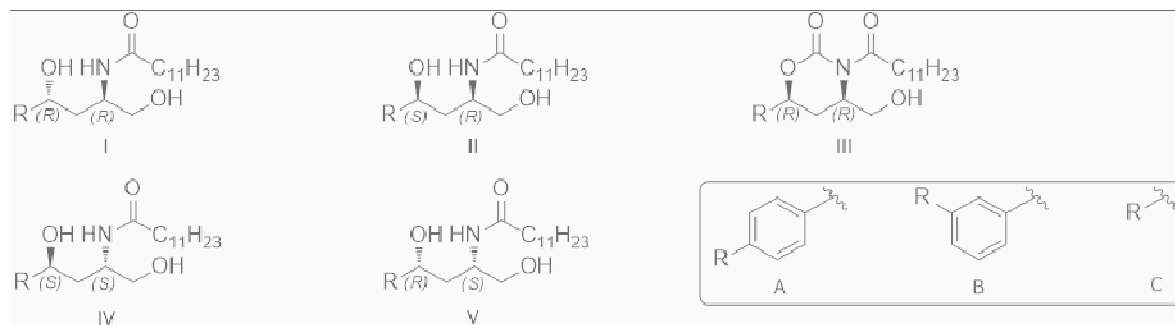


Tableau 18 - Résultats de la modélisation moléculaire et liaison *in vitro* pour les analogues HPAs
(ND : non déterminé)

Ligand	Type structure	substituant		MolDock	Rerank	HA	LE1	LE3	EC ₅₀ (nM)	Liaison de la sonde (% du contrôle)
		type	R							
L101	I	A	H	-149,68	-115,42	26	-5,76	-4,44	22000	32,35 ± 5,86
L102	I	A	Me	-145,48	-111,54	27	-5,39	-4,13	ND	42,76 ± 0,36
L103	I	A	OMe	-152,95	-121,51	28	-5,46	-4,34	ND	43,21 ± 9,07
L104	I	A	C ₆ H ₁₃	-164,54	-124,07	32	-5,14	-3,88	317	26,92 ± 3,41
L105	I	A	C ₁₀ H ₂₁	-188,57	-142,99	36	-5,24	-3,97	443	ND
L106	I	B	C ₆ H ₁₃	-170,58	-116,26	32	-5,33	-3,63	123	ND
L107	I	B	C ₁₀ H ₂₁	-199,26	-152,72	36	-5,53	-4,24	674	42,99 ± 4,76
L108	I	C	C ₁₀ H ₂₁	-180,66	-135,02	30	-6,02	-4,50	106	20,36 ± 0,98
L109	II	A	H	-153,89	-121,60	26	-5,92	-4,68	4000	38,01 ± 5,28
L110	II	A	OMe	-163,16	-130,55	28	-5,83	-4,66	ND	20,59 ± 1,38
L111	II	A	C ₆ H ₁₃	-190,94	-139,07	32	-5,97	-4,35	84,9	18,78 ± 2,31
L112	II	A	C ₁₀ H ₂₁	-207,05	-156,42	36	-5,75	-4,34	41,8	ND
L113	II	B	C ₆ H ₁₃	-188,58	-141,58	32	-5,89	-4,42	1,50	ND
L114	II	B	C ₁₀ H ₂₁	-190,28	-132,21	36	-5,29	-3,67	32,4	14,71 ± 1,43
L115	II	C	C ₁₀ H ₂₁	-164,64	-122,28	30	-5,49	-4,08	63,2	21,49 ± 5,92
L116	II	C	C ₁₄ H ₂₉	-201,55	-145,88	34	-5,93	-4,29	ND	ND
L117	II	C	Cy	-148,61	-116,83	26	-5,72	-4,49	ND	32,13 ± 6,35
L118	II	C	<i>t</i> -Bu	-142,13	-113,36	2	-5,92	-4,72	ND	54,52 ± 6,98
L119	III	A	Me	-141,22	-114,32	27	-5,23	-4,23	ND	75,57 ± 4,64
L120	III	C	Ph	-131,79	-110,35	26	-5,07	-4,24	ND	49,10 ± 6,12
L121	III	C	<i>t</i> -Bu	-138,75	-115,26	26	-5,34	-4,43	ND	51,36 ± 4,16
L122	IV	A	H	-150,40	-116,39	26	-5,78	-4,48	25000	42,99 ± 6,37
L123	V	A	H	-148,86	-118,96	26	-5,73	-4,58	159000	34,39 ± 0,70

La corrélation des résultats *in silico* et *in vitro* sur cette série permet de faire ressortir quelques grandes tendances de relations structure-activité.

- *La configuration des deux centres asymétriques*

De façon cohérente avec les résultats obtenus pour les quatre stéréoisomères de l'HPA-12, les HPAs de configuration (1*R*,3*S*)-*syn* (type II) sont les mieux reconnus de cette série, devant les HPAs de type I de configuration (1*R*,3*R*)-*anti*. La modélisation des complexes formés à partir des analogues substitués a permis de proposer une interprétation à cette sélectivité, que n'avait pas révélée l'étude des HPA-12 eux-mêmes (*vide infra*).

- *La longueur de la chaîne aliphatique*

Parmi les analogues HPAs aliphatiques de type 3-désoxy-phytoCer L108, L115, L116, L117 et L118 (cf. Figure 36), ceux présentant une chaîne aliphatique (L108, L115 et L116) sont mieux reconnus par la protéine que les dérivés tronqués portant un groupement encombrant tel que *t*Bu (L118) ou Cy (L117). La modélisation indique que la présence d'une longue chaîne alkyle augmenterait les interactions hydrophobes le long des parois lipophiles de la cavité de START, non observées pour L117 et L118, et induirait une orientation favorable de la tête polaire permettant l'établissement de liaisons hydrogène au site de liaison, notamment avec Glu446. Il est à noter que le mode de liaison observé dans les poses calculées des analogues aliphatiques de type II (1*R*,3*S*)-*syn* (L115 et L116) est très similaire à celui du D-*ribo*-phytocéramide lui-même, un des meilleurs ligands de cette étude.

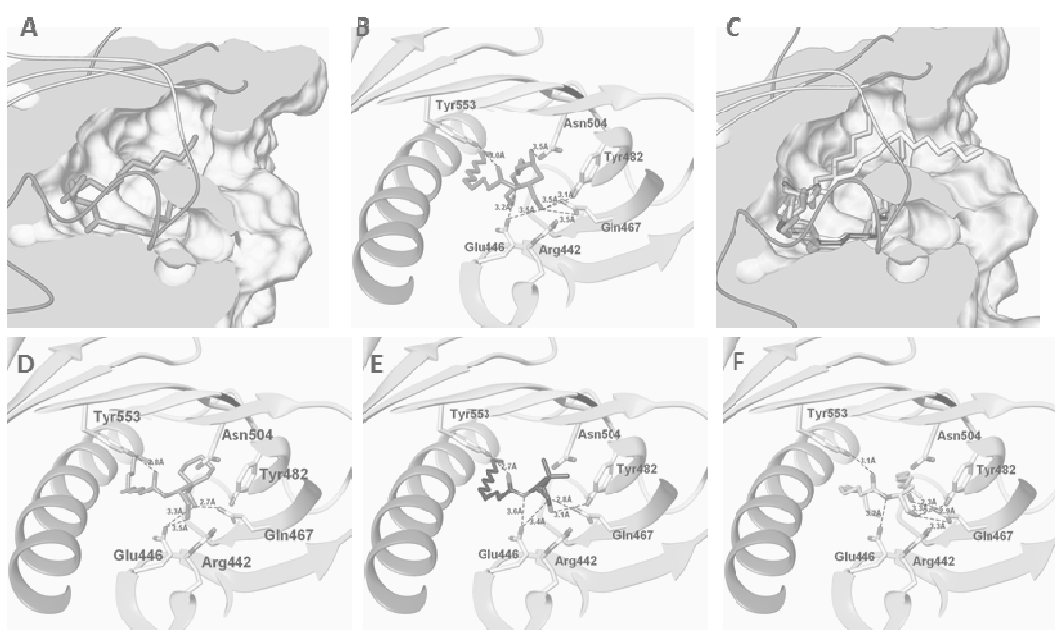


Figure 36 - A) Pose retenue de L108, B) Interactions calculées entre L108 et START, C) Poses retenues de L115 (turquoise), L116 (crème), L117 (mauve) et L118 (noir), D) Interactions entre L117 et START, E) Interactions entre L118 et START, F) Interactions entre L115 et START.

Parmi les analogues aromatiques des HPA-12 (cf. Figure 37), l'ajout d'une chaîne lipophile sur le cycle aromatique est aussi très favorable à la reconnaissance (L101 à comparer avec L102 à L108, et L109 à comparer avec L110 à L116). La présence de ce motif lipidique permettrait là encore selon la modélisation d'augmenter les interactions hydrophobes du ligand, mimant les interactions de la chaîne sphingioïde du céramide. D'autre part, ce résidu aliphatique semble induire une meilleure

structuration du complexe, orientant ainsi l'extrémité polaire du ligand de façon à maximiser les liaisons hydrogènes développées au fond du site de liaison. En effet, les poses calculées des quatre stéréoisomères HPA-12 montrent une orientation assez similaire de la tête polaire,⁴¹ alors que les analogues substitués présentent une orientation des hydroxyles plus tranchée selon leur configuration, déjà observée en série aliphatique entre L108 et L115 (cf. Figure 37 B et F). Ainsi, d'après la modélisation, les analogues (1*R*,3*R*)-*anti* de type I développeraient des liaisons hydrogènes avec Glu446, Gln467, Tyr553 et Asn504, tout comme les (1*R*,3*R*)-*anti*-HPAs co-cristallisés, alors que les analogues (1*R*,3*S*)-*syn* de type II établiraient des liaisons hydrogènes avec Glu446, Gln467, Tyr553 et Tyr482. En particulier, les poses calculées montrent un reversement complet d'orientation spatiale de l'hydroxyle secondaire en C-3 interagissant, soit avec Asn504 (configuration 3*R* présente dans les co-structures cristallines), soit avec Glu446, Gln467 et Tyr482 (configuration révisée 3*S*). Le fort réseau de liaisons hydrogène établi entre les deux hydroxyles et le NH de l'amide sur la même face de la molécule permettrait ainsi d'expliquer la meilleure affinité de la série (1*R*,3*S*)-*syn*.

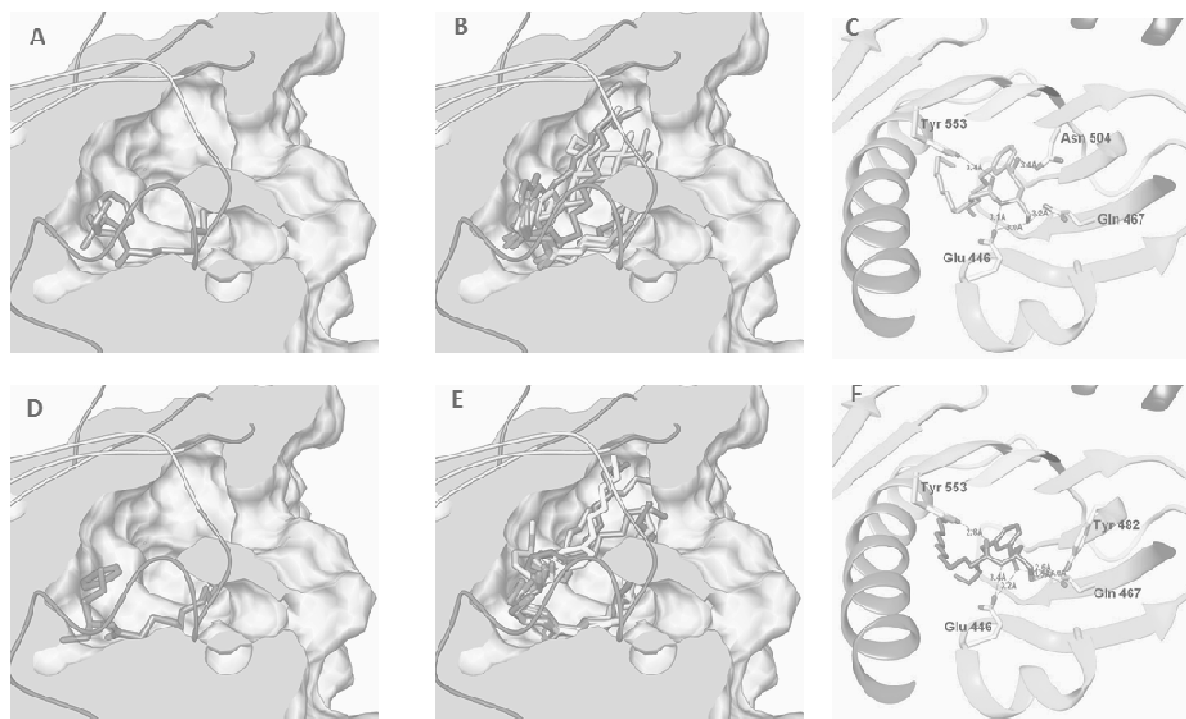


Figure 37 - A) Pose retenue de L101, B) Poses retenues des analogues HPAs-*anti* : L102 (violet), L104 (turquoise), L105 (bleu), L106 (rose) et L107 (orange), C) Interactions entre L106 et START, D) Pose retenue de L109, E) Poses retenues des analogues HPAs-*syn* : L110 (orange), L111 (jaune), L112 (vert), L113 (lila) et L114 (violet), F) Interaction entre L113 et START.

Enfin, les composés ayant une chaîne hexyle interagissent plus favorablement avec la protéine que les composés ayant une chaîne décyle (L104/L105, L106/L107 et L113/L114).

- *La position de la chaîne sur les analogues aromatiques*

Sur l'ensemble des analogues de type I et II, les composés substitués en *méta* sont mieux reconnus que les composés substitués en *para*. Dans la série (1*R*,3*R*)-*anti* de type I, l'analyse des poses retenues de L102, L104 et L105, substitués en *para*, montre une orientation du cycle phényle identique à celle des (1*R*,3*R*)-HPAs co-cristallisés, alors que le cycle phényle de L106 et L107, substitué en *méta*, montre une rotation de 90°. Cette rotation du cycle phényle entre les dérivés substitués en *para* et en *méta* est aussi observée sur les analogues (1*R*,3*S*)-*syn* de type II. L'analyse des poses

calculées n'a toutefois pas permis de corrélérer cette tendance à des interactions spécifiques du noyau aromatique dans l'une ou l'autre des orientations.

- *Conclusion*

Le profil optimal issu de cette analyse des relations structure-activité correspond donc à un analogue de configuration (1*R*,3*S*), avec un noyau phényle substitué en *mé*ta par une chaîne hexyle.

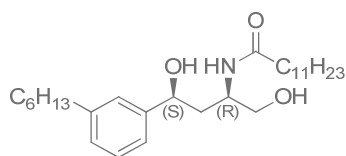


Figure 38 - Structure du ligand L113

L'analogue L113, rassemblant l'ensemble de ces conditions, présente une EC_{50} de liaison au domaine START de la protéine CERT de 1,5 nM, soit trois ordres de grandeur inférieure à celle de l'HPA-12 L109, présentant la même configuration (EC_{50} 4 μ M). Cette augmentation d'affinité est très significative au regard de la modification structurale assez faible introduite (ajout d'une chaîne aliphatique en C6). Au-delà du gain évident en interactions hydrophobes, la modélisation suggère que l'ajout du motif aliphatique induirait une plus forte structuration du complexe ligand-protéine conduisant à une interaction maximisée de la tête polaire du ligand. Un impact plus prononcé de la configuration du centre C-3 sur les EC_{50} de liaison à la protéine comparé à la série des HPA-12 non-substitués (L101, L109, L122 et L123) est cohérent avec l'analyse *in silico* qui montre, par ailleurs, des conformations liées très distinctes pour les diastéréoisomères 3*R* et 3*S*. Enfin, il est à noter qu'avant cette étude, aucun modèle de liaison des HPAs de configuration révisée (1*R*,3*S*)-*syn* n'avait été proposé, les études cristallographiques ayant été conduites avec la série (1*R*,3*R*)-*anti*.

b) Iminosucre

L'étude *in vitro/in silico* réalisée jusque-là a montré i) qu'une amine protonée pouvait interagir avec le carboxylate de Glu446 en mimant le NH de l'amide du ligand naturel Cer (cas de la Sph) et que ii) la présence d'une telle amine au sein d'une structure cyclique pouvait être favorable si la conformation de la molécule était figée de manière appropriée (cas de la jaspine B). Ces deux observations nous ont conduits à imaginer des mimes de Cer à squelette iminosucre. L'analyse de la conformation cristalline du Cer lié au sein de la cavité du domaine START, suggérant une disposition pseudo-diaxiale des deux hydroxyles portés par un cycle en conformation chaise, a renforcé cette démarche.

Des structures cycliques azotées, azépanes ou pipéridines (de type didéoxyiminoxylitol et didéoxynojirimicyne) ont été évaluées *in silico*. Les poses retenues montrent qu'elles adoptent la même conformation que le céramide co-cristallisé à la protéine (cf. Figure 39), permettant ainsi de mimer les interactions céramide-domaine START.

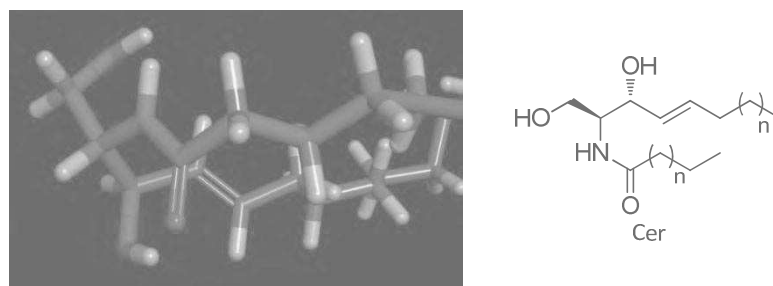
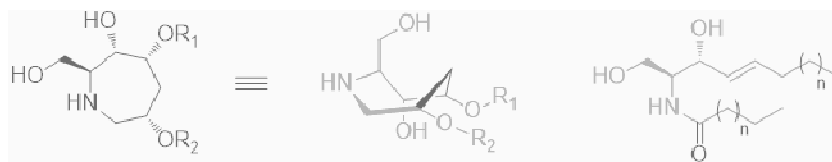


Figure 39 - Conformation du céramide co-cristallisé avec le domaine START de CERT

- Analogues azépanes



Le ligand L055 (avec $R_1=H$ et $R_2=C_{13}H_{27}$ sur le schéma ci-dessus) est ressorti comme l'un des meilleurs ligands du criblage *in silico* sur la base des scores *LE1* et *LE3*. D'après les optimisations menées sur les analogues HPAs, l'ajout d'une seconde chaîne lipidique favorise la reconnaissance, i) en augmentant les interactions hydrophobes avec les parois de la cavité du domaine START et, ii) en induisant le positionnement de la tête polaire pour maximiser les liaisons hydrogène entre le ligand et la protéine. Ainsi, bien que les scores des descripteurs *LE1* et *LE3* soient plus faibles, la modélisation indique que, en terme de conformité avec la structure du céramide complexé, les structures les plus prometteuses de cette série sont les azépanes du type L046 et L048.

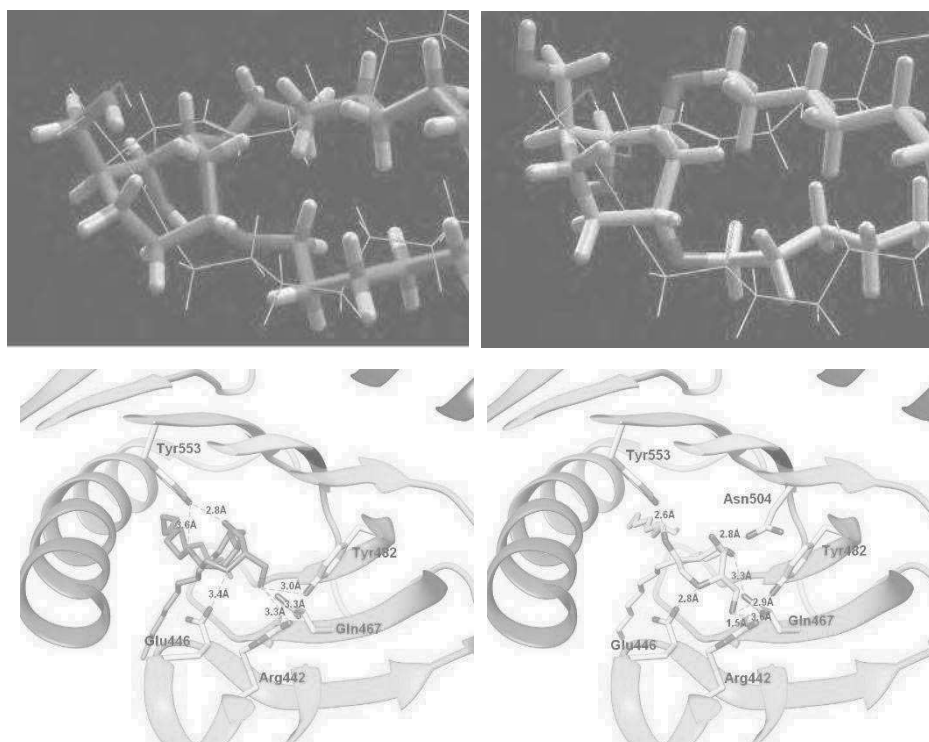
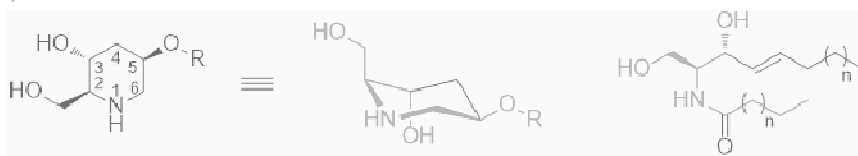


Figure 40 - Poses retenues de L046 (en rose, à gauche) et de L048 (en jaune, à droite) superposées avec le céramide co-cristallisé (en gris) et interactions avec le domaine START

L'azote de l'azépane se superpose avec celui du céramide, tout comme les alcools primaires et secondaires. D'après les interactions calculées entre L046 et le domaine START de CERT, la présence d'une seconde chaîne stabiliserait le réseau de liaisons hydrogènes par rapport à L055, en faisant intervenir des résidus supplémentaires. Le positionnement de la chaîne OR₁ en position axiale favoriserait la reconnaissance par le développement d'une liaison hydrogène supplémentaire entre l'oxygène de l'éther et Gln467 (cf. Figure 40). Une synthèse de ces composés, avec différentes longueurs de chaînes, est envisagée à partir de l'aldéhyde de Garner (cf. Chapitre IV) pour permettre leur évaluation *in vitro*.

- Analogues pipéridines

Pipéridines 2,3,5-substituées



Le ligand L060 est un iminosucre de type pipéridine qui est apparu comme l'un des ligands ayant les meilleures valeurs *LE1* et *LE3* au cours du criblage virtuel. L'observation de sa pose calculée fait ressortir une bonne superposition des alcools primaire et secondaire de la pipéridine avec ceux du céramide, ainsi que l'oxygène de la fonction éther de L060 avec celui de l'amide du céramide. En revanche, l'azote du ligand est décalé par rapport à celui du céramide. L'amine est alors trop éloignée pour développer une liaison hydrogène avec le Glu446. La synthèse de cet analogue est en

cours au laboratoire en collaboration avec le Pr. Antonio Burtoloso (Institut de Chimie de São Carlos, Université de São Paulo, Brésil) (cf. Chapitre IV).

Un meilleur positionnement de l'azote sur le ligand L060 permettrait de rétablir cette interaction primordiale dans la reconnaissance, comme observé pour les dérivés iminosucres analogues d'isofagomine de type II, L030 à L033, modélisés au cours du criblage virtuel (cf. Figure 41).

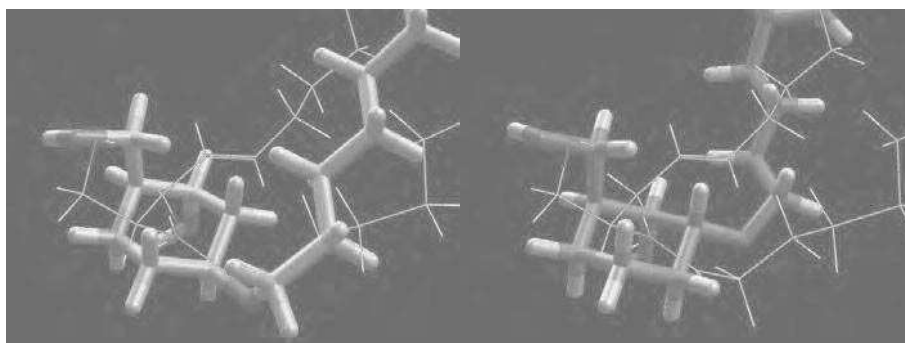
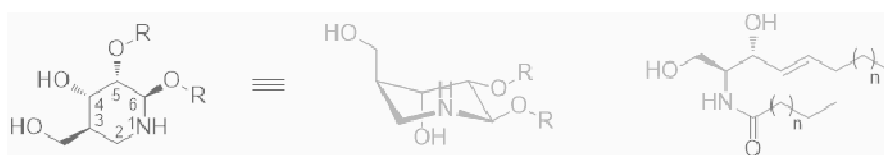


Figure 41 - Poses retenues de L060 (en bleu) et de L033 (en rose) superposées avec la structure cristalline du céramide (en gris)

Pipéridines 3,4,5,6-substituées



D'après la modélisation, la combinaison de deux structures L060 et L033 représentées ci-dessus (cf. Figure 41) permettrait d'une part une position optimale de l'azote et des hydroxyles, augmentant ainsi les interactions fortes avec les résidus polaires au fond de la cavité. D'autre part, les interactions hydrophobes avec le domaine START seraient plus importantes grâce à la présence de deux chaînes lipidiques. Cet analogue, de type 3-*epi-ent*-nœuromycine (L124), constitue donc un mime optimisé du céramide. Sa synthèse est envisageable à partir du β -D-*lyxo*-pyranose selon la méthode de M. Bols⁴² (cf. Chapitre IV).

Pipéridines 3,4,5-substituées

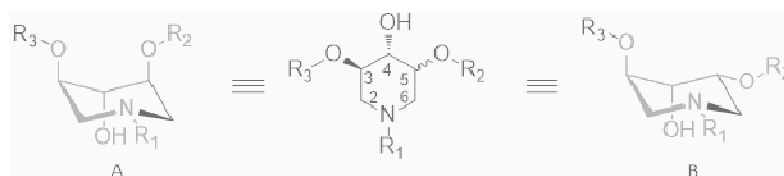


Tableau 19 - Résultats de la modélisation moléculaire et liaison *in vitro* pour les analogues pipéridines 3,4,5-trihydroxylés (ND : non déterminé)

Ligand	Type	R ₁	R ₂	R ₃	MolDock	Rerank	HA	LE1	LE3	Liaison de la sonde (% du contrôle)
L125	B	C ₁₂ H ₂₅	C ₁₂ H ₂₅	H	-197,61	-151,32	33	-5,99	-4,59	54,30 ± 8,09
L126	B	H	C ₁₂ H ₂₅	H	-113,64	-95,63	21	-5,41	-4,55	61,31 ± 3,42
L127	B	C ₁₂ H ₂₅	H	H	ND	ND	21	ND	ND	ND
L128	A	H	C ₁₂ H ₂₅	H	-115,62	-96,05	21	-5,51	-4,57	40,95 ± 1,16

L129	A	C ₁₂ H ₂₅	H	H	-120,46	-99,04	21	-5,74	-4,72	47,96 ± 11,01
L130	A	H	C ₁₂ H ₂₅	C ₁₂ H ₂₅	-178,65	-137,66	33	-5,41	-4,17	51,13 ± 3,08
L131	A	C ₁₂ H ₂₅	C ₁₂ H ₂₅	H	-197,89	-147,28	33	-6,00	-4,46	30,10 ± 4,01

Une alternative simplifiée au ligand L124, est la pipéridine 3,4,5-trihydroxylée de type B, L125. La modélisation de ce composé indique une bonne superposition de l'atome d'azote du ligand avec celui du céramide, ainsi que des alcools, ce qui permettrait de reproduire le réseau de liaison hydrogène développé par le ligand naturel. La chaîne *O*-alkyle adopte la même disposition que le squelette sphingoïde du céramide et la chaîne *N*-alkyle suit l'orientation de la chaîne amide du céramide (cf. Figure 44). Le composé L125, ainsi que les analogues L126 et L127 variablement *N*-alkylé et/ou *O*-alkylé, ont été synthétisés sous forme racémique au laboratoire en collaboration avec le Dr. Antonio Burtoloso en vue de leur évaluation *in vitro* (cf. Chapitre IV).

Dans le cadre d'une collaboration avec le Pr. Philippe Compain (Laboratoire de Synthèse Organique et Molécules Bioactives, Université de Strasbourg), nous avons eu accès à différentes pipéridines trihydroxylées de type A et B, dont L129, un analogue de L040 identifié lors du criblage virtuel. Divers analogues didéoxyiminoxylitols (type A, DIX) *N*-alkylés et/ou *O*-alkylés et leur diastéréoisomères en C-5 (type B) ont été modélisés. Leur liaison avec le domaine START a été évaluée *in vitro* par le test FLINT. L'ensemble des résultats est reporté dans le Tableau 19 et la Figure 43.

D'après la modélisation et les données de liaison, l'ensemble des composés de cette série est reconnu par la protéine. Pour les composés de type A, série DIX (L128 à L131), une tendance nette se dégage de l'analyse des résultats du test de liaison et des poses calculées. Le composé L130, comportant deux chaînes *O*-alkyles en positions 3 et 5, est le moins bien reconnu de la série. Bien que les chaînes du ligand conservent l'orientation des chaînes du céramide, permettant ainsi de mimer les interactions hydrophobes, leur orientation semble contraindre le cycle pipéridine dans une conformation non favorable pour développer des liaisons hydrogènes avec les résidus à proximité. Notamment, le décalage de l'azote de la pipéridine empêcherait son interaction avec le Glu446. Les meilleures interactions sont obtenues avec les chaînes alkyles placées en positions 1 et 5. Ainsi la chaîne *O*-alkyle de L128 mimerait la chaîne sphingoïde du céramide (malgré le léger décalage observé) et la chaîne *N*-alkyle de L129 mimerait la chaîne amide du céramide. L'orientation de ces chaînes permettrait un positionnement idéal du motif pipéridine. Une bonne superposition des atomes d'azotes de la pipéridine et du céramide est observée. Il en est de même pour les groupements hydroxyles (cf. Figure 42). Cette disposition permettrait ainsi de mimer le réseau de liaisons hydrogènes du céramide complexé au domaine START de CERT.

Le ligand L131, le meilleur de cette série, combinerait les deux critères favorables à la reconnaissance : la présence de deux chaînes lipidiques en position 1 et 5 et un maximum de liaisons hydrogène avec les résidus présents au fond de la cavité du domaine START grâce au bon positionnement du motif pipéridine (cf. Figure 42).

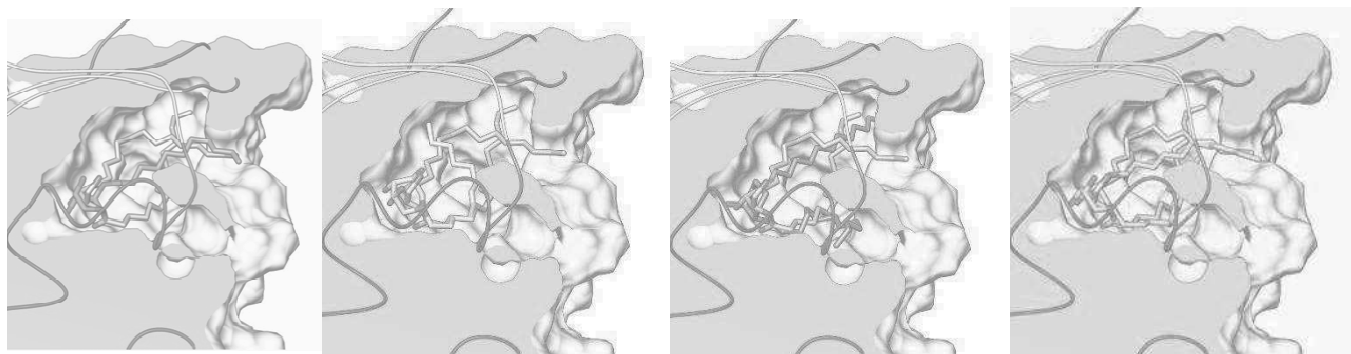


Figure 42 - Poses retenues de L128 (en rose), de L129 (en jaune), de L130 (en vert) et de L131 (en bleu) superposées avec le céramide co-cristallisé (en gris)

La même tendance est observée pour les diastéréoisomères en C-5 des DIX, de type B. Ainsi, le ligand L125, combinant les conditions favorables pour développer des interactions avec le domaine START, est le meilleur de cette série (cf. Figure 43).

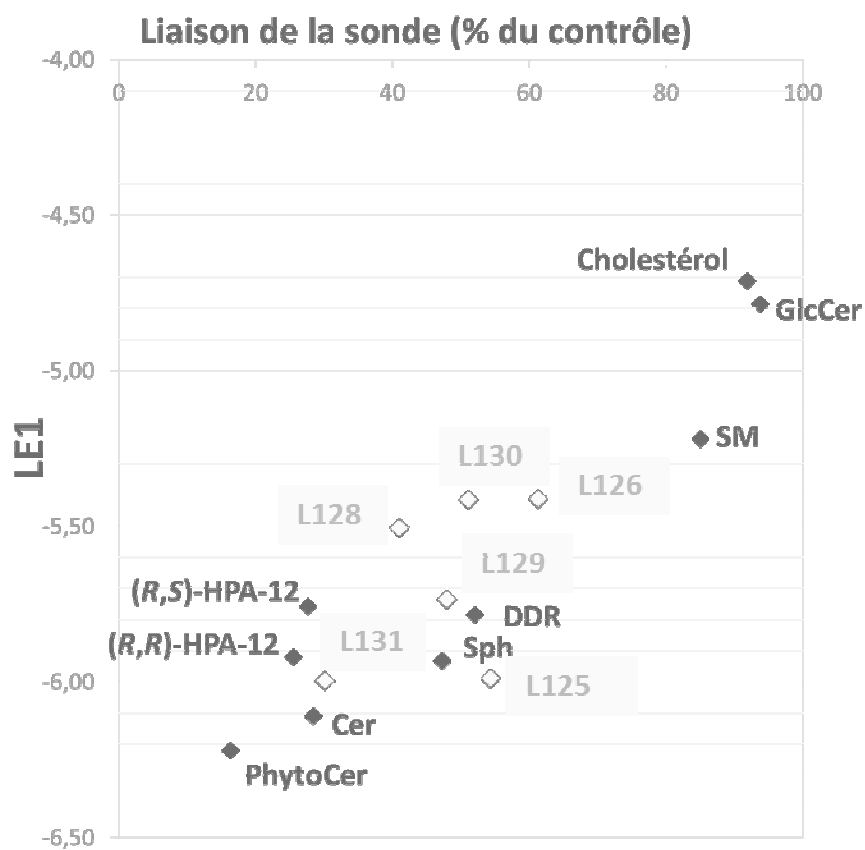


Figure 43 - Corrélation du LE1 et de la liaison de la sonde

Il est cependant intéressant d'observer la nette différence de liaison entre les deux diastéréoisomères L125 et L131 (cf. Tableau 19). L'analyse détaillée des liaisons hydrogènes développées dans les poses calculées pour ces deux composés fait ressortir une différence d'interaction de l'atome d'oxygène de la fonction éther en C-5 entre les configurations équatoriale ou axiale, pouvant expliquer la différence de liaison au domaine START de ces deux épimères. Cet atome d'oxygène n'interagirait en effet pas avec les résidus voisins lorsque la chaîne *O*-alkyle est en position équatoriale (type B), alors qu'une liaison hydrogène avec la Gln467 serait présente lorsque la chaîne est en position axiale. La conformation « tout-axial » des pipéridines de type A semble ainsi, d'après la pose calculée, être optimale pour la reconnaissance par la protéine. Une telle conformation a déjà été proposée par le Pr. Philippe Compain comme étant à l'origine de l'activité remarquable de dérivés DIX alkylés vis-à-vis de la glucocérébrosidase.⁴³

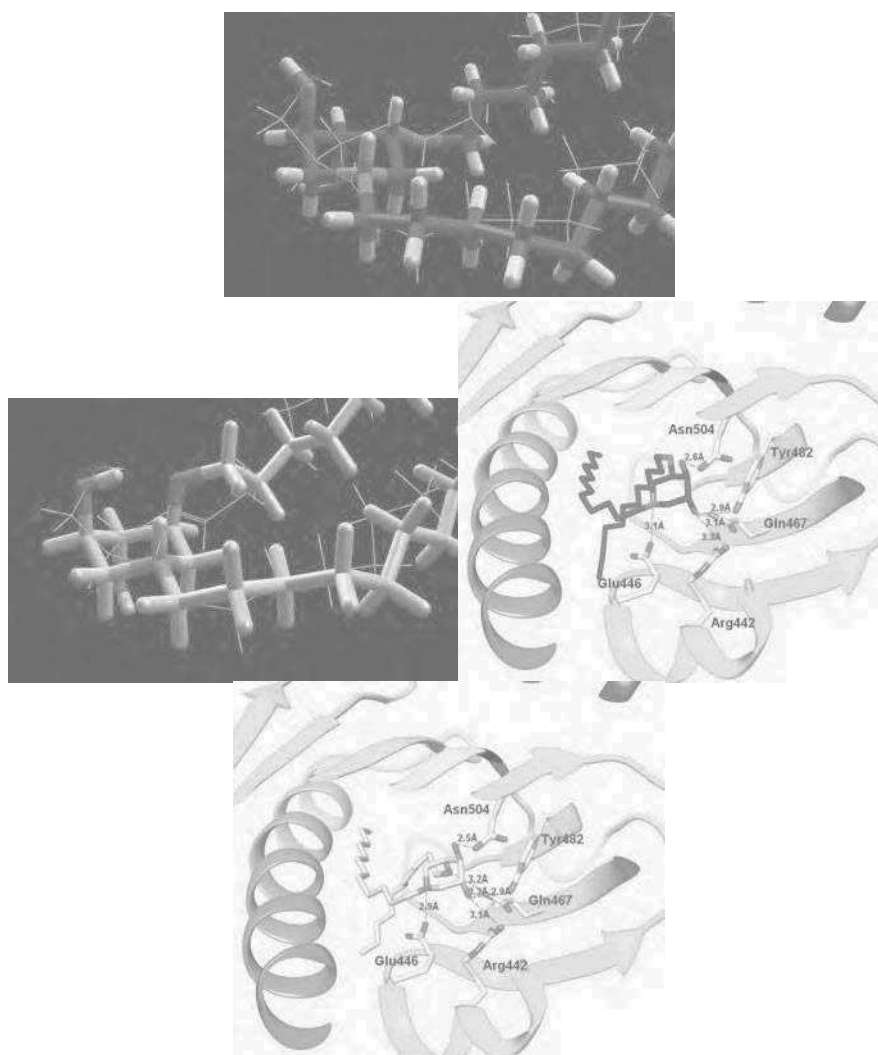


Figure 44 - Poses retenues de L125 (en bleu) et L131 (en blanc) superposées avec la structure cristalline du céramide (en gris) et interactions développées avec le domaine START

Pipéridines de type déoxynojirimycine

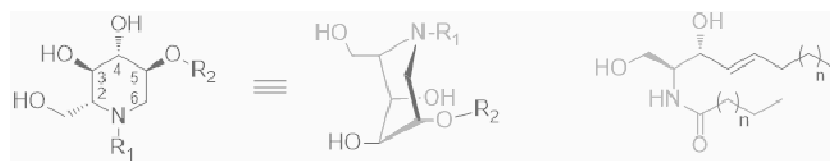


Tableau 20 - Résultats de la modélisation moléculaire et liaison *in vitro* pour les analogues déoxynojirimycine
(ND : non déterminé)

Ligand	R ₁	R ₂	MolDock	Rerank	Heavy atoms	LE1	LE3	Liaison de la sonde (% du contrôle)
L132	C ₁₂ H ₂₅	C ₁₂ H ₂₅	-201,67	-144,74	35	-5,76	-4,14	38,91 ± 5,91
L133	H	C ₁₂ H ₂₅	-122,47	-95,37	23	-5,32	-4,15	34,62 ± 3,16
L134	C ₁₂ H ₂₅	H	-134,61	-107,94	23	-5,85	-4,69	26,02 ± 5,56
L135	C ₆ H ₁₃	H	-92,90	-76,67	17	-5,46	-4,51	ND
L136	C ₈ H ₁₇	H	-106,78	-86,77	19	-5,62	-4,57	ND
L137	C ₁₀ H ₂₁	H	-123,70	-95,01	21	-5,89	-4,52	ND
L138	C ₁₄ H ₂₉	H	-137,15	-111,40	25	-5,49	-4,46	ND
L139	C ₁₆ H ₃₃	H	-142,00	-112,05	27	-5,26	-4,15	ND
L140	C ₁₈ H ₃₇	H	-147,91	-117,45	29	-5,10	-4,05	ND

La collaboration avec le Pr. Philippe Compain nous a aussi donné accès aux analogues de la déoxynojirimycine (DNJ) L132 à L134. Ces composés ont été évalués *in silico* et *in vitro* par le test de liaison FLINT au domaine START.

L'ensemble des résultats est reporté dans le Tableau 20 et la Figure 45.

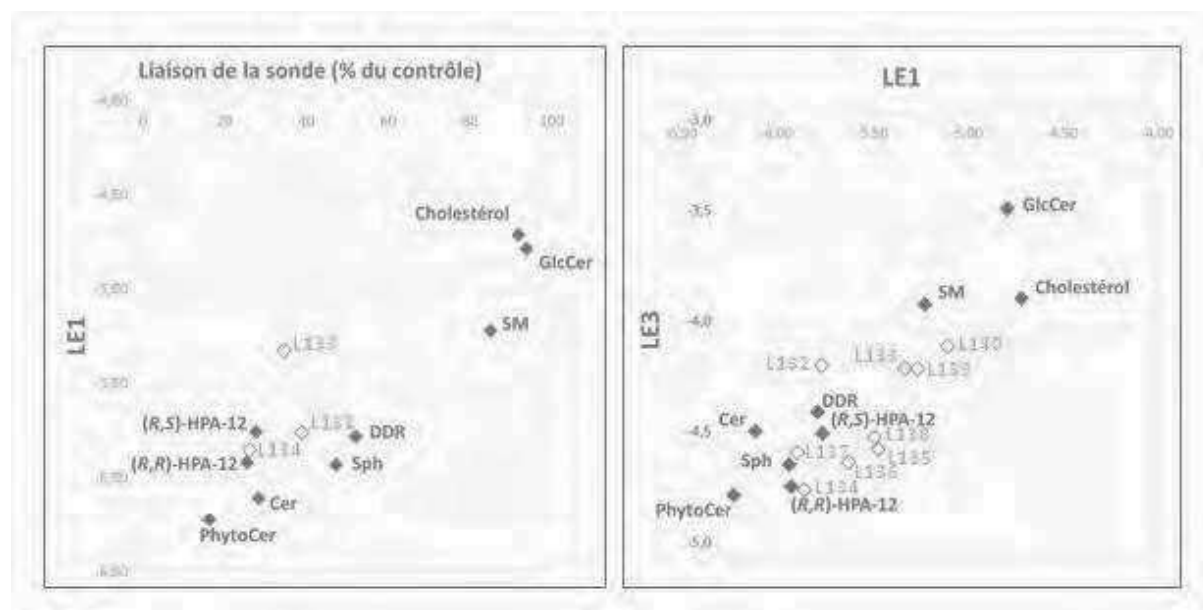


Figure 45 - Corrélation du LE1, LE3 et liaison de la sonde

Les dérivés de type DNJ n'apparaissent pas, a priori, comme de bons mimes de Cer du fait des configurations opposées dans ces deux familles, du centre asymétrique portant l'alcool primaire. Il nous a toutefois paru intéressant de confronter notre démarche de conception rationnelle à des molécules ne répondant pas au modèle initial. Contre toute attente, le composé L134 a présenté une liaison forte avec le domaine START dans le test FLINT. De même, les ligands *O*-alkylés L132 et L133 ont été reconnus par la protéine.

D'après la modélisation dans le site de fixation du céramide au domaine START, le plan de la pipérine des DNJ serait perpendiculaire au plan de la pipéridine des DIX (cf. Figure 46). Ce mode de liaison différent modifie donc l'influence des chaînes lipidiques. L'analyse des résultats de modélisation et de liaison indique que la présence d'une chaîne *N*-alkyle (en position 1) permet de mimer la chaîne amide du céramide. En revanche, la présence d'une chaîne *O*-alkyle en position 5 n'est plus favorable et semble perturber la liaison avec la protéine en imposant une déviation du cycle. Le composé L134, possédant uniquement une chaîne *N*-alkyle, ressort ainsi comme le meilleur ligand de cette série. Dans la pose retenue, les atomes d'azote et les alcools primaires de la pipéridine et du céramide se superposent. L'alcool secondaire en position 3 mimerait celui du céramide. Les autres hydroxyles permettraient de développer des liaisons hydrogènes supplémentaires avec les résidus Arg442, Tyr482 et Asn504.

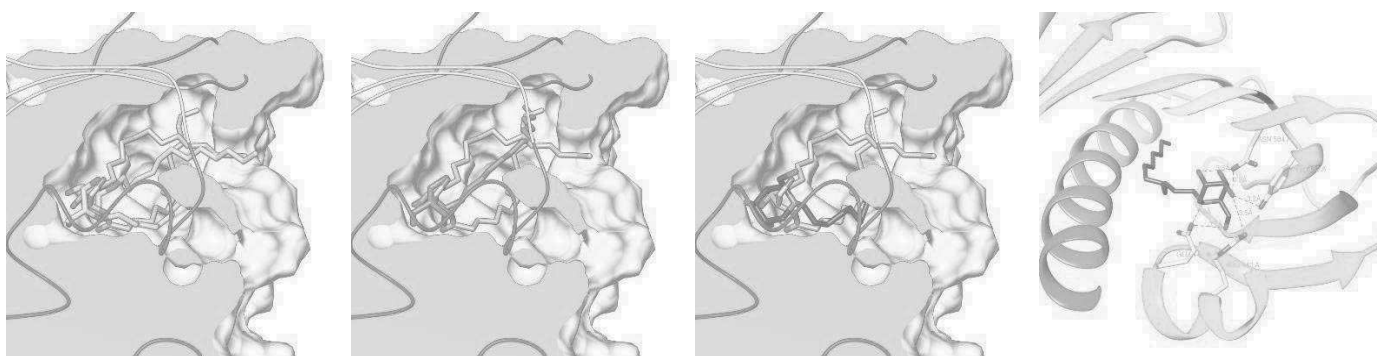
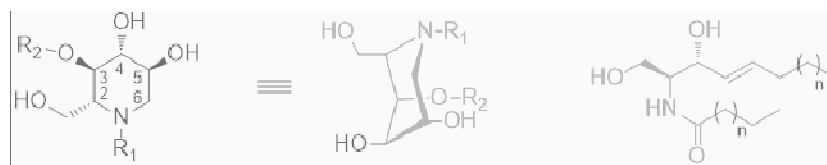


Figure 46 - Poses retenues de L132 (en rose), de L133 (en violet) et de L134 (en marron) superposées avec le céramide co-cristallisé (en gris), et interactions de L134 développées avec le domaine START



D'après la modélisation, l'ajout d'une chaîne aliphatique en position 3 permettrait de mimer le squelette sphingoïde du céramide et favoriserait la reconnaissance du composé en augmentant les interactions hydrophobes le long des parois de la cavité du domaine START (cf. Figure 47). En outre, l'ajout d'une chaîne aliphatique en O3 permettrait vraisemblablement d'apporter une sélectivité de ce dérivé vis-à-vis d'autres cibles comme la glucocérébrosidase ou la glucosylcéramide synthase pour lesquelles des inhibiteurs de type *N*-alkyl déoxynojirimycine sont connus. Le dérivé de la DNJ optimisé par l'introduction d'une seconde chaîne aliphatique, L141, est en cours de synthèse au laboratoire du Pr. Philippe Compain en vue de son évaluation *in vitro*.

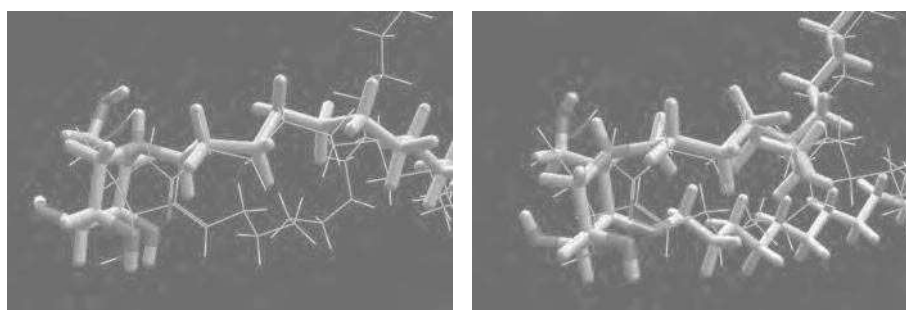


Figure 47 - Poses retenues de L134 (en jaune) et L141 (en blanc) superposées avec la structure cristalline du céramide (en gris)

D'autres optimisations, telle que la longueur des chaînes alkyles, pourront être apportées par la suite sur cette série. En effet, la modélisation des ligands L135 à L140, analogues de L134, a montré un optimum d'interaction avec des chaînes entre 9 et 13 carbones (cf. Figure 45).

V. Conclusion

Dans un premier temps, l'analyse structurale du domaine START de CERT et des ligands co-cristallisés nous a permis d'identifier les paramètres clés dans la reconnaissance de ligands.

A partir de ces observations, nous avons pu développer une méthode d'arrimage moléculaire capable de reproduire les poses cristallographiques des céramides, HPAs et diacylglycérol et de discriminer les composés ligands ou non ligands de la protéine. Cette méthode a été validée qualitativement par la corrélation des résultats de modélisation et de liaison *in vitro* avec le domaine START. Après validation de cette méthode, deux stratégies ont été adoptées.

La première stratégie correspondait à une approche par criblage. Un filtre *in silico* basé sur une méthodologie d'arrimage moléculaire a été appliquée sur une ligandothèque focalisée, de manière à explorer l'interaction avec la protéine. En parallèle, un criblage *in vitro* a été réalisé en collaboration avec les Drs. Laurence Fleury et Frédéric Ausseil. La combinaison du criblage virtuel et du criblage *in vitro* a permis d'identifier de nouveaux ligands du domaine START de CERT.

La seconde stratégie reposait sur une conception rationnelle de nouveaux ligands. Cette approche s'est tout d'abord basée sur l'optimisation des HPAs en collaboration avec les Pr. Adam Daïch et Dr. Dušan Berkeš. Dans un second temps, la modélisation a permis d'élaborer des mimes du céramide de type iminosucres en collaboration avec les Pr. Antonio Burtoloso et Pr. Philippe Compain.

Ainsi, cette étude a permis d'identifier trois nouvelles classes de composés : la jaspine B et analogues, les HPAs à deux chaînes lipidiques et les iminosucres type azépane et pipéridine, comme ligands du domaine START.

Des essais sur des cellules CHO et LY-A pourraient nous renseigner sur le potentiel antagoniste de ces ligands sur la protéine CERT.

Des méthodes biophysiques, telles que le système Biacore™, seraient intéressantes à mettre en œuvre pour déterminer des indices d'affinité *in vitro*. Une optimisation des résultats obtenus par arrimage pourrait être réalisée par la mise en place de nouveaux descripteurs afin d'obtenir des métriques plus fines capables de mieux corrélérer les affinités théoriques et expérimentales sur l'ensemble des composés évalués.

Enfin, la production de cristaux du domaine START complexé avec ces composés, puis la détermination de leurs structures par cristallographie aux rayons X, nous permettrait de préciser les conformations de ces complexes ainsi que les interactions protéine-ligand. Ces nouvelles structures permettraient alors de valider les hypothèses issues de ce travail.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

DOCKING

Structures extraction, alignment and preparation

All protein structures used were extracted from PDB data base and visualized using Accelrys Discovery Studio Visualizer (<http://accelrys.com>, Accelrys Software Inc., Discovery Studio Modeling Environment, Release 4.0, San Diego: Accelrys Software Inc., 2013) and UCSF Chimera 1.8.1 (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>, Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, supported by the NIGMS P41-GM103311). Each individual protein chain were separated and identified using Accelrys Discovery Studio Visualizer.

Protein structures were structurally aligned with structure 2E3N set as reference using UCSF Chimera/Matchmaker. The protein structures in the reference space were prepared (structure checks, rotamers, hydrogenation) using Accelrys Discovery Studio Visualizer.

The co-crystallized ligand structures were extracted from protein structures using SciTE text editor (<http://www.scintilla.org/SciTE.html>) and Accelrys Discovery Studio Visualizer. The ligands were merged in libraries encoded with various chemical using Discovery Studio Visualiser. The libraries were checked using ChemAxon Marvin 5.5 (<http://www.chemaxon.com>) and eventually corrected using previous cited software.

Docking protocol

Molecular studies (docking, scoring) were carried with Molegro Virtual Docker 6 software (<http://www.clcbio.com>).

The structure 2E3P (chain A: 2E3Pa) was chosen for molecular docking. A corresponding Molegro's workspace, in the reference space, was generated and the ligand's libraries were included in this workspace (allowing a direct comparison between crystallographic conformations and docking poses). A search space volume of 15 Å radius centered in the CERT binding domain was chosen for docking. Ligands and binding pocket were set flexible during the calculation. According to structural study 42 residues were defined for flexible docking: Phe436, Arg442, Trp445, Glu446, Thr447, Thr448, Ile449, Ile465, Gln467, Thr468, His469, Lys470, Arg471, Val472, Trp473, Pro474, Ala475, Ser476, Gln477, Arg478, Val480, Tyr482, Asn504, Ala521, Ile523, Val525, Tyr553, Ala555, Val557, Pro559, Trp562, Ala563, Pro564, Val567, Leu568, Val571, Ala572, Arg574, Glu575, Tyr576, Lys578 et Phe579.

A tolerance of 0.99, a flexibility of 0.90 and softened potentials were used during docking. Values of 2000 steps (lateral chains of residues) and 2000 steps (backbone) were used for final minimization (default values). No water molecules (entropy penalty or presence of HOH atoms) were taken in account.

Moldock was used as scoring function with a grid resolution of 0.20 Å. *Moldock SE* was used as docking optimizer with a population size of 200 (other parameters set as default) and 5000 steps of calculation (in order to reach convergence) by run. Each compound was docked iteratively using 20 independent runs. A tabu clustering was used in order to rank by energy (*total energy* or *MolDock*)

the poses before final minimization. A set of 20 poses per ligand was generated, using a *RMSD* threshold of 2.0 Å and *Energy penalty* of 100 (default values) as clustering parameters. For each ligand the poses with lowest scores were selected for visual analysis.

Template (pharmacophoric model) scoring (*Similarity score*) was used in calculations with a grid resolution of 0.20 Å and a strength of 500 (default value). Each template is defined by a sphere centered in a particular position. Template centers were defined on a basis of structurally aligned atoms of same chemical features. Then, 3 similarity groups were defined: (i) a steric group of 19 atoms (1.8 Å radius, strength = 0.5); (ii) a hydrogen donor group of 3 atoms (1.8 Å radius, strength = 3) and (iii) a hydrogen acceptor group of 3 atoms (1.8 Å radius, strength = 3).

Ligand library

The new ligand structures were sketched using ChemAxon Marvin 5.5. The ligands were prepared (hybridization, hydrogenation, some geometry optimizations, 3D sketching), aligned (center of mass) with co-crystallized ligands in the previously defined reference space and merged in the ligand libraries using Accelrys Discovery Studio Visualiser.

All ligands containing an amine function were evaluated under its protonated form, that is predominant at physiological pH.

Visualisation

Docking results were first analysed using Molegro Virtual Docker and Molegro Data Modeler software (score, hydrogen bonds). Then, best poses were visualised into the protein using UCSF Chimera software.

IN VITRO FLINT BINDING ASSAY

Recombinant START domain was purchased from Abcam, TALON® metal affinity resin was from Clontech, *D-erythro*-sphingosine, C16-*D-erythro*-ceramide, (*S*)-didecanoylglycerol (DDR), C16- β -D-glucosylceramide, cholesterol and N-palmitoyl-sphingosylphosphorylcholine from Avanti polar lipids, Inc. Fluorescence spectra were recorded with a Carey Eclipse spectrofluorometre equipped with a xenon lamp source and a Hamamatsu R928 photomultiplier tube.

The His-tagged recombinant START domain of CERT protein (200pmol, 6.5mg, 13 μ L of 0.5mg/mL commercial solution) was dissolved in TBS (46 μ L) in an Eppendorf tube. The competitor (200pmol, 2 μ L of 0.1mM ethanolic solution) and TBS (30 μ L) were added to the tube and the mixture was incubated at 37°C for 30 minutes. An equimolar amount of ceramide probe (200pmol, 2 μ L of 0.1mM ethanolic solution) was then added and after 30 minutes of incubation, the resulting complex was retained on a TALON® metal affinity resin (40 μ L of 50% (v/v) preequilibrated with wash buffer), and incubated for 10 min at room temperature with rotary shaking. After centrifugation (14000rpm, 30s), the supernatant was collected as the “free fraction”. For washing, the resin was suspended in a 10mM imidazole solution in TBS (75 μ L), and after centrifugation (14000rpm, 30s); the supernatant was collected as the “wash fraction 1”. This washing step was repeated to give the “wash fraction 2”. To liberate the protein bound fraction to the TALON® resin, the resin was suspended in a 250mM imidazole solution in TBS (75 μ L) and incubated for 5 minutes at room temperature. After centrifugation (14000rpm, 30s), the supernatant was collected as the “bound fraction”. A solution of chloroform/methanol (1:2 (v/v), 3.75-fold volume of each fraction) was then added to each collected fraction. Finally, to retrieve residual fluorophores non-specifically bound to the resin in the tube, TBS (85 μ L) and chloroform/methanol (1:2 (v/v), 375 μ L) were added to the resin in the tube, mixed, and centrifuged (14000rpm, 30s). The supernatant was collected as the “residual fraction”. For each fraction, the fluorescence was quantified with a Cary Eclipse spectrofluorimeter (NBD: excitation at 465nm, emission at 530 nm).

Ratio between the fluorescence intensity of this “bound fraction” and that of gathered washing fractions (“unbound fraction”) allows quantification of the probe binding to the START domain of CERT. Probe shifting results in a reduction of fluorescence intensity in this “bound fraction” in comparison to a blank experiment without competitor and compound binding was quantified by this percentage of fluorescence diminution.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Kudo, N.; Kumagai, K.; Tomishige, N.; Yamaji, T.; Wakatsuki, S.; Nishijima, M.; Hanada, K.; Kato, R. Structural basis for specific lipid recognition by CERT responsible for nonvesicular trafficking of ceramide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, 105, 488-493.
2. Kudo, N.; Kumagai, K.; Matsubara, R.; Kobayashi, S.; Hanada, K.; Wakatsuki, S.; Kato, R. Crystal Structures of the CERT START Domain with Inhibitors Provide Insights into the Mechanism of Ceramide Transfer. *J. Mol. Biol.* **2010**, 396, 245-251.
3. Huang, S.-Y.; Zou, X. Ensemble docking of multiple protein structures: Considering protein structural variations in molecular docking. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2007**, 66, 399-421.
4. Wang, R.; Lai, L.; Wang, S. Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2002**, 16, 11-26.
5. Gohlke, H.; Hendlich, M.; Klebe, G. Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* **2000**, 295, 337-356.
6. Velec, H. F. G.; Gohlke, H.; Klebe, G. DrugScoreCSDKnowledge-Based Scoring Function Derived from Small Molecule Crystal Data with Superior Recognition Rate of Near-Native Ligand Poses and Better Affinity Prediction. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 6296-6303.
7. Wang, R.; Lu, Y.; Wang, S. Comparative Evaluation of 11 Scoring Functions for Molecular Docking. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 2287-2303.
8. Li, Y.; Liu, Z.; Li, J.; Han, L.; Liu, J.; Zhao, Z.; Wang, R. Comparative Assessment of Scoring Functions on an Updated Benchmark: 1. Compilation of the Test Set. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, 54, 1700-1716.
9. Sousa, S. F.; Ribeiro, A. J. M.; Coimbra, J. T. S.; Neves, R. P. P.; Martins, S. A.; Moorthy, N. S. H. N.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. Protein-Ligand Docking in the New Millennium; A Retrospective of 10 Years in the Field. *Curr. Med. Chem.* **2013**, 20, 2296-2314.
10. Thomsen, R.; Christensen, M. H. MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 3315-3321.
11. Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, D. E.; Francis, P.; Shenkin, P. S. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1739-1749.
12. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* **1997**, 267, 727-748.
13. Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T.; Klebe, G. A Fast Flexible Docking Method using an Incremental Construction Algorithm. *J. Mol. Biol.* **1996**, 261, 470-489.
14. Jain, A. N. Surflex: Fully Automatic Flexible Molecular Docking Using a Molecular Similarity-Based Search Engine. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 499-511.
15. Lie, M. A.; Thomsen, R.; Pedersen, C. N. S.; Schiøtt, B.; Christensen, M. H. Molecular Docking with Ligand Attached Water Molecules. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, 51, 909-917.
16. Sapre, N.; Gupta, S.; Sapre, N. Assessing ligand efficiencies using template-based molecular docking and Tabu-clustering on tetrahydroimidazo-[4,5,1-jk][1,4]-benzodiazepin-2(1H)-one and-thione (TIBO) derivatives as HIV-1RT inhibitors. *J. Chem. Sci.* **2008**, 120, 395-404.

17. Hanada, K.; Hara, T.; Fukasawa, M.; Yamaji, A.; Umeda, M.; Nishijima, M. Mammalian Cell Mutants Resistant to a Sphingomyelin-directed Cytolysin: Genetic and Biochemical Evidence for Complex Formation of the LCB1 Protein with the LCB2 Potein for Serine Palmitoyltransferase. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 33787-33794.
18. Fukasawa, M.; Nishijima, M.; Hanada, K. Genetic Evidence for ATP-dependent Endoplasmic Reticulum-to-Golgi Apparatus Trafficking of Ceramide for Sphingomyelin Synthesis in Chinese Hamster Ovary Cells. *J. Cell Biol.* **1999**, 144, 673-685.
19. Hanada, K.; Kumagai, K.; Yasuda, S.; Miura, Y.; Kawano, M.; Fukasawa, M.; Nishijima, M. Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* **2003**, 426, 803-809.
20. Pagano, R. E.; Martin, O. C.; Kang, H. C.; Haugland, R. P. A novel fluorescent ceramide analogue for studying membrane traffic in animal cells: accumulation at the Golgi apparatus results in altered spectral properties of the sphingolipid precursor. *J. Cell Biol.* **1991**, 113, 1267-1279.
21. Pagano, R. E.; Sepanski, M. A.; Martin, O. C. Molecular trapping of a fluorescent ceramide analogue at the Golgi apparatus of fixed cells: interaction with endogenous lipids provides a trans-Golgi marker for both light and electron microscopy. *J. Cell Biol.* **1989**, 109, 2067-2079.
22. Hullin-Matsuda, F.; Tomishige, N.; Sakai, S.; Ishitsuka, R.; Ishii, K.; Makino, A.; Greimel, P.; Abe, M.; Laviad, E. L.; Lagarde, M.; Vidal, H.; Saito, T.; Osada, H.; Hanada, K.; Futerman, A. H.; Kobayashi, T. Limonoid Compounds Inhibit Sphingomyelin Biosynthesis by Preventing CERT Protein-dependent Extraction of Ceramides from the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 24397-24411.
23. Yasuda, S.; Kitagawa, H.; Ueno, M.; Ishitani, H.; Fukasawa, M.; Nishijima, M.; Kobayashi, S.; Hanada, K. A Novel Inhibitor of Ceramide Trafficking from the Endoplasmic Reticulum to the Site of Sphingomyelin Synthesis. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 43994-44002.
24. Charruyer, A.; Bell, S. M.; Kawano, M.; Douangpanya, S.; Yen, T.-Y.; Macher, B. A.; Kumagai, K.; Hanada, K.; Holleran, W. M.; Uchida, Y. Decreased Ceramide Transport Protein (CERT) Function Alters Sphingomyelin Production following UVB Irradiation. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 16682-16692.
25. Funakoshi, T.; Yasuda, S.; Fukasawa, M.; Nishijima, M.; Hanada, K. Reconstitution of ATP- and Cytosol-dependent Transport of de Novo Synthesized Ceramide to the Site of Sphingomyelin Synthesis in Semi-intact Cells. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 29938-29945.
26. Hanada, K. Discovery of the molecular machinery CERT for endoplasmic reticulum-to-Golgi trafficking of ceramide. *Mol. Cell. Biochem.* **2006**, 286, 23-31.
27. Kumagai, K.; Nishijima, M.; Hanada, K. Chapter 6 - Reconstitution Assay System for Ceramide Transport With Semi-Intact Cells. In *Methods in Cell Biology*, Gilbert Di, P.; Markus, R. W., Eds. Academic Press. **2012**, 108, 117-129.
28. Beckers, C. J. M.; Keller, D. S.; Balch, W. E. Semi-intact cells permeable to macromolecules: Use in reconstitution of protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *Cell* **1987**, 50, 523-534.
29. Kumagai, K.; Yasuda, S.; Okemoto, K.; Nishijima, M.; Kobayashi, S.; Hanada, K. CERT Mediates Intermembrane Transfer of Various Molecular Species of Ceramides. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 6488-6495.
30. Sugiki, T.; Takahashi, H.; Nagasu, M.; Hanada, K.; Shimada, I. Real-time assay method of lipid extraction activity. *Anal. Biochem.* **2010**, 399, 162-167.
31. Tuuf, J.; Kjellberg, M. A.; Molotkovsky, J. G.; Hanada, K.; Mattjus, P. The intermembrane ceramide transport catalyzed by CERT is sensitive to the lipid environment. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembranes* **2011**, 1808, 229-235.

32. Combemale, S.; Santos, C.; Rodriguez, F.; Garcia, V.; Galaup, C.; Frongia, C.; Lobjois, V.; Levade, T.; Baudoin-Dehoux, C.; Ballereau, S.; Genisson, Y. A biologically relevant ceramide fluorescent probe to assess the binding of potential ligands to the CERT transfer protein. *RSC Adv.* **2013**, 3, 18970-18984.
33. Nakamura, Y.; Matsubara, R.; Kitagawa, H.; Kobayashi, S.; Kumagai, K.; Yasuda, S.; Hanada, K. Stereoselective Synthesis and Structure–Activity Relationship of Novel Ceramide Trafficking Inhibitors. (1*R*,3*R*)-*N*-(3-Hydroxy-1-hydroxymethyl-3-phenylpropyl)dodecanamide and Its Analogues. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 3688-3695.
34. Ďuriš, A.; Wiesenganger, T.; Moravčíková, D.; Baran, P.; Kožíšek, J.; Daich, A.; Berkeš, D. Expedient and Practical Synthesis of CERT-Dependent Ceramide Trafficking Inhibitor HPA-12 and Its Analogues. *Org. Lett.* **2011**, 13, 1642-1645.
35. Ueno, M.; Huang, Y.-Y.; Yamano, A.; Kobayashi, S. Revised Stereochemistry of Ceramide-Trafficking Inhibitor HPA-12 by X-ray Crystallography Analysis. *Org. Lett.* **2013**, 15, 2869-2871.
36. Yasuda, S.; Kitagawa, H.; Ueno, M.; Ishitani, H.; Fukasawa, M.; Nishijima, M.; Kobayashi, S.; Hanada, K. A novel inhibitor of ceramide trafficking from endoplasmic reticulum to the site of sphingomyelin synthesis. *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 24162.
37. Pan, Y.; Huang, N.; Cho, S.; MacKerell, A. D. Consideration of Molecular Weight during Compound Selection in Virtual Target-Based Database Screening. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, 43, 267-272.
38. García-Sosa, A. T.; Hetényi, C.; Maran, U. Drug efficiency indices for improvement of molecular docking scoring functions. *J. Comput. Chem.* **2010**, 31, 174-184.
39. Santos, C.; Rogriguez, F.; Garcia, V.; Moravčíková, D.; Berkeš, D.; Daich, A.; Levade, T.; Baudoin-Dehoux, C.; Ballereau, S.; Génisson, Y. Identification of Novel CERT Ligands as Potential Ceramide Trafficking Inhibitors. *ChemBioChem* **2014**, 15, 2522-2528.
40. Fleury, L.; Faux, C.; Santos, C.; Ballereau, S.; Génisson, Y.; Ausseil, F. Development of a CERT START Domain–Ceramide HTRF Binding Assay and Application to Pharmacological Studies and Screening. *J. Biomol. Screen.* **2015**, 20, 779-787.
41. Santos, C.; Fleury, L.; Rodriguez, F.; Markus, J.; Berkeš, D.; Daich, A.; Ausseil, F.; Baudoin-Dehoux, C.; Ballereau, S.; Génisson, Y. The CERT antagonist HPA-12: First practical synthesis and individual binding evaluation of the four stereoisomers. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 2004-2009.
42. Andersch, J.; Bols, M. Efficient Synthesis of Isofagomine and Noeuromycin. *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 3744-3747.
43. Compain, P.; Martin, O. R.; Boucheron, C.; Godin, G.; Yu, L.; Ikeda, K.; Asano, N. Design and Synthesis of Highly Potent and Selective Pharmacological Chaperones for the Treatment of Gaucher's disease. *ChemBioChem* **2006**, 7, 1356-1359.

Chapitre III – Jaspine B et dérivés de la Jaspine B

I.	Activité de la jaspine B et analogues.....	155
1)	La jaspine B et mécanisme moléculaire	155
2)	Relations structure-activité de la jaspine	159
a)	Stéréochimie du cycle	159
b)	Bioisostères de la jaspine B	159
c)	Modifications de la chaîne	160
3)	Conclusion préliminaire sur l'activité de la jaspine et hypothèses de travail	161
II.	Synthèses de la jaspine B	162
1)	Synthèses de la jaspine B à partir d'un précurseur chiral	163
a)	A partir de phytosphingosine	163
b)	A partir de la L-sérine	165
c)	A partir de l'acide tartrique	169
d)	A partir de carbohydrates et dérivés carbohydrates	170
2)	Synthèses asymétriques de la jaspine B à partir de molécules simples.....	177
III.	Nouvelle voie d'accès à la jaspine B	184
IV.	Synthèse de sondes fluorescentes de la jaspine B : vers une compréhension de son mode d'action.....	194
1)	Synthèse à partir de l'oxazolidinone vinylique (210)	194
2)	Synthèse à partir de l'oxazolidinone lactone (214).....	198
3)	Imagerie de fluorescence	203
V.	Conclusion	204
	PARTIE EXPÉRIMENTALE	205
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	225

I. Activité de la jaspine B et analogues

L'étude de modélisation moléculaire et le test de liaison spécifique par intensité de fluorescence, présentés dans le chapitre précédent, ont permis d'identifier la jaspine B (L001) et des analogues de la jaspine B (L003 et L004) comme ligands du domaine START de la protéine CERT. Nous nous sommes ainsi intéressés à cette famille de composés afin d'approfondir la connaissance de leur mode d'action. Pour répondre à cette problématique, nous avons dans un premier temps étudié les différents mécanismes cellulaires et les voies de synthèse de ce composé rapportés dans la littérature. Nous avons ensuite développé une nouvelle voie d'accès à la jaspine B, ainsi qu'à des sondes dérivées de la jaspine B afin d'observer le mode d'action cellulaire de ce dérivé par imagerie de fluorescence.

1) La jaspine B et mécanisme moléculaire

La jaspine B (ou pachastrissamine) est un composé naturel d'origine marine. En 2002, T. Higa rapporte l'isolement et la caractérisation d'un nouvel analogue de SL à partir de l'éponge marine *Pachastrissa* sp.⁴ Un an plus tard, C. Débitus identifie deux nouvelles anhydrophytosphingosines, la jaspine A (**1**) et la jaspine B (**2**), à partir de l'éponge *Jaspis* sp. (cf. Figure 1).⁵

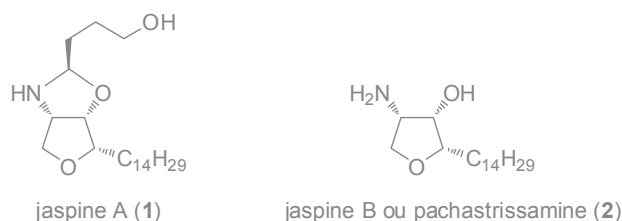


Figure 1 - Structure des anhydrophytosphingosines isolées

Des analyses de masse, de RMN et des études de dérivatisation chimique ont permis de confirmer la structure de la jaspine B, qui s'est avérée identique à la pachastrissamine.⁶

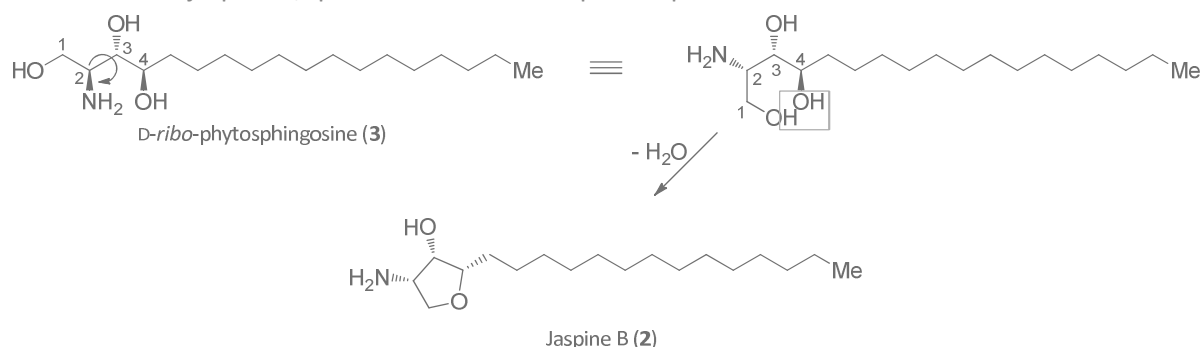


Figure 2- Cyclo-déshydratation de la D-ribo-phytosphingosine (**3**) en jaspine B (**2**) (extrait de la thèse de Y. Salma⁷)

La jaspine B possède un squelette tétrahydrofurane *cis* tri-substitué de configuration absolue (2*S*,3*S*,4*S*). Cette structure est issue d'une cyclodéshydratation formelle entre les groupements hydroxyles des carbones C1 et C4 de la D-ribo-phytosphingosine (**3**), d'où l'appellation anhydrophytosphingosine de ce composé (cf. Figure 2).

La cytotoxicité de la jaspine B, salifiée ou non, a été étudiée sur différentes lignées de cellules cancéreuses humaine: P-388 (cellules leucémiques),⁴ A-549 (adénocarcinome du poumon),^{4, 8-10} HT-29 (adénocarcinome épithélium colique),⁴ MeL-28 (mélanome),^{4, 11} KB (carcinome oral humain),^{5, 10} MCF-7 (adénocarcinome mammaire),^{10, 12, 13} HCT-116 (carcinome colorectal),^{12, 14, 15} EC-9706 (carcinome œsophagien),¹³ MGC-803 (carcinome gastrique),¹³ MDA-231 (adénocarcinome mammaire),¹⁶ CNE (carcinome nasopharyngien),¹⁶ HeLa (adénocarcinome du col de l'utérus),^{11, 12, 16} U2OS (ostéosarcome),¹⁵ MDA-MB-231 (adénocarcinome mammaire),¹² Caco-2 (adénocarcinome colorectal),¹² Jurkat (lymphome de lymphocyte T),¹² PC-3 (adénocarcinome de la prostate),⁹ A-375 (mélanome)¹⁷ et WM-115 (mélanome),¹⁷ sur des lignées de cellules cancéreuses murines : B-16 et B-16F10 (mélanome);^{11, 17} ainsi que sur cellules non malignes, telles que NiH3T3 (fibroblaste)^{10, 12} et GM637 (fibroblaste).¹⁵ L'ensemble des valeurs des Cl_{50} de la jaspine B et de ses sels est rassemblé dans le Tableau 1.

Ces études mettent en évidence des valeurs de Cl_{50} de l'ordre du micromolaire, voire sub-micromolaire sur les lignées cancéreuses, avec une cytotoxicité dose-dépendante et temps-dépendante. Des cytotoxicités moindres sont observées pour les cellules non cancéreuses NiH3T3, indiquant une sélectivité d'action de la jaspine B sur les cellules cancéreuses.

Le fort potentiel cytotoxique de la jaspine B nous a amené, ainsi que différentes équipes, à étudier le mode d'action de cette molécule. Différents mécanismes provoquant la mort cellulaire, variable selon les lignées cellulaires, ont été identifiés comme étant à l'origine de la cytotoxicité de la jaspine B.

N. Fujii et H. Ohno ont ainsi comparé *in vitro* le pouvoir inhibiteur sur différentes kinases de la jaspine B et de la *N,N*-diméthylsphingosine (DMS), composé de référence pour l'inhibition de sphingosine kinase (SK) et protéine kinase C (PKC).¹⁸ La jaspine B a alors été identifiée comme nouvel inhibiteur de SK1, SK2, PKC ζ et PKC ι , kinases cibles pour induire l'apoptose. Un an après, T.Y. Kim décrit une inhibition de la production de kinase cycline dépendante de type 2 (Cdk2), provoquant l'arrêt du cycle cellulaire, sur des cellules A-375 et B16F10 traitées à la jaspine B.⁹ De plus, ce traitement bloque la phosphorylation de FOXO3 par des kinases régulées par un signal extracellulaire (ERK).^{9, 19} La phosphorylation de FOXO3 entraîne son externalisation du noyau vers le cytoplasme où il peut subir une dégradation. La jaspine B sur-régule la localisation de la forme non phosphorylée FOXO3 dans le noyau, permettant d'activer l'expression de gènes cibles pro-apoptotiques tels que *Bim* et la protéine pro-apoptotique p27^{Kip1}.

A. Delgado a étudié le traitement de cellules A-549 avec la jaspine B en présence ou non d'un inhibiteur d'autophagie, la 3-méthyladénine. Ces travaux font ressortir l'implication potentielle de l'autophagie, via une augmentation de production de dihydrocéramide (DhCer), comme mécanisme de mort cellulaire induit par la jaspine B.⁸

Dans le même temps, les travaux de thèse de Y. Salma dans le laboratoire ont permis de montrer que le traitement par la jaspine B de cellules B-16 et Mel-28 induit sélectivement l'inhibition de la synthèse de SM et l'accumulation de Cer dans la cellule, par action sur la SMS et potentiellement sur la protéine de transport de céramide CERT, sans agir sur la GCS. De plus, cette perturbation du métabolisme des SLs par la jaspine B s'accompagne de l'externalisation de phosphatidylsérine, translocation de cytochrome *c* de la mitochondrie vers le cytosol, et du clivage de caspases

entraînant l'apoptose. En revanche, ce mécanisme d'apoptose ne semble pas être le seul à l'origine de la mort cellulaire puisqu'une mort résiduelle des cellules B-16 traitées par la jaspine B est toujours observée malgré l'ajout d'inhibiteur de caspase zVAD.¹¹

Tableau 1- Activité cytotoxique de la Jaspine

[illegible]

ND : non déterminé

Valeurs en bleue : incubation 24h ; valeurs en

violet : incubation 48h ; valeurs en vert :

incubation 72h ; valeurs en orange : incubation

96h ; valeur en noir : temps d'incubation non

rapporté

^a Cl₅₀: concentration en composé testé pour

laquelle une diminution de viabilité des cellules

de 50% est observée par rapport aux cellules

témoins non traitées

^b valeurs converties de $\mu\text{g/mL}$ en $\mu\text{mol/L}$

^c cytotoxicité déterminée en utilisant l'acide

phosphatase (APA assay)

^d cytotoxicité déterminée en utilisant la

sulphorhodamine B ^{1, 2}^e cytotoxicité déterminée en utilisant le bromure

de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazole (méthode MTT) ³^f cytotoxicité déterminée en utilisant le sel WST-

1 (méthode MTT)

^g cytotoxicité déterminée en utilisant l'adénosine

triphosphate et luciférase (ATPlite assay)

2) Relations structure-activité de la jaspine

Bien que la jaspine B possède une structure simple, différentes modifications structurales ont été réalisées afin de mieux comprendre et améliorer son activité cytotoxique sur les cellules cancéreuses ou son activité d'inhibition de SKs. Parmi ces modifications, on trouve des modulations au niveau du cycle tétrahydrofurane de la jaspine B (par stéréoisomérisation et bioisostérie) ainsi que de la chaîne.

a) Stéréochimie du cycle

En 2009, A. Delgado décrit la synthèse de la jaspine B et de ses diastéréoisomères (**4**), (**5**) et (**6**) à partir de différentes phytosphingosines et compare la cytotoxicité de ses composés sur des cellules A-549.⁸

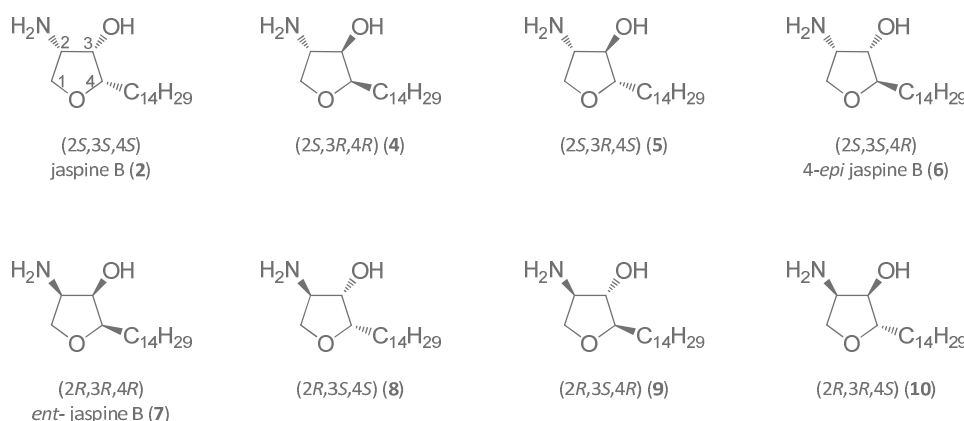


Figure 3 - Stéréoisomères de la jaspine B

Dans ces travaux, la jaspine B apparaît comme le stéréoisomère le plus cytotoxique avec une LD_{50} de $0.13 \pm 0.01 \mu M$. La modification d'un seul centre asymétrique entraîne une perte de cytotoxicité d'un facteur 10 ((**5**) : $1.50 \pm 0.03 \mu M$ et (**6**) : $1.25 \pm 0.003 \mu M$) et la modification de deux centres asymétriques provoque une baisse de cytotoxicité d'un facteur 20 ((**4**) : $2.5 \pm 0.04 \mu M$). La cytotoxicité de la jaspine B est donc dépendante de la stéréochimie du cycle. Cela a été confirmé par notre étude de cytotoxicité de la jaspine B et son énantiomère (**7**) sur des cellules HCT-116, U2OS et GM-637.¹⁵ L'*ent*-jaspine B présente une cytotoxicité 10 à 20 fois plus faible que son énantiomère selon les lignées cellulaires. La cytotoxicité de la jaspine B est très dépendante de la stéréochimie du cycle tétrahydrofurane.

N. Fujii et S. Oishi comparent en 2011 les activités inhibitrices de la jaspine B et de ses stéréoisomères (**4**) à (**10**) sur les SK1 et SK2 par rapport au DMS.¹⁸ L'ensemble des composés sont des inhibiteurs de SK présentant des activités similaires ou meilleures que l'inhibiteur de référence. Les composés (**8**) et (**9**) sont ressortis comme les plus actifs sur la SK, avec un pouvoir d'inhibition 4 à 14 fois plus élevé que la jaspine B et jusqu'à 28 fois plus élevé que le DMS.

b) Bioisostères de la jaspine B

Différents bioisostères de la jaspine B avec la substitution de l'oxygène du cycle tétrahydrofurane par un atome d'azote,¹⁷ de soufre, de sélénium¹⁴ ou de carbone²⁰ ont été synthétisés au cours des années précédentes.

L'ensemble des aza-jaspine B (**11**), (**12**), (**13**), (**14**) et (**15**) développées dans l'équipe présentent des cytotoxicités comparables à la jaspine B sur les lignées B-16, A-375 et WM-115, avec des CI_{50} de

l'ordre du micromolaire. Les composés les plus cytotoxiques, (**11**) et (**14**), montrent l'inhibition de la conversion du Cer en SM tout comme la jaspine B sur les cellules B-16.

Les analogues (**16**), (**17**) présentent eux aussi une cytotoxicité comparable à celle de la jaspine B sur les lignées HCT-116, A-549 et PC-3.

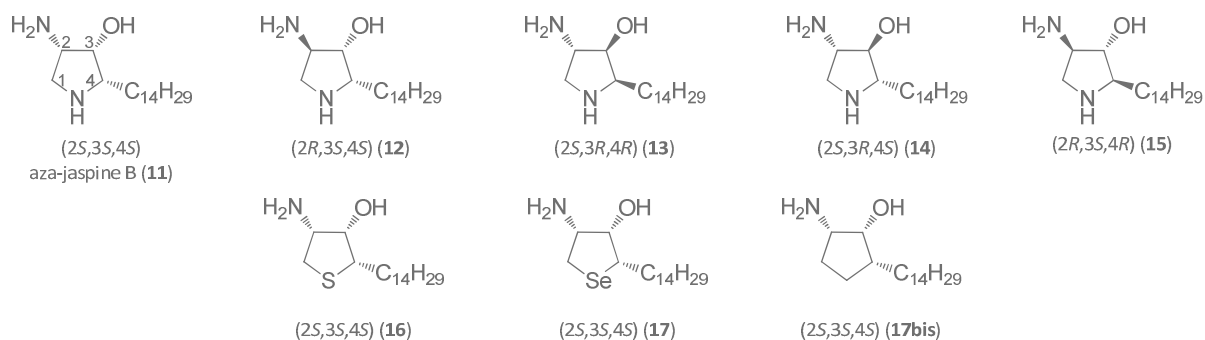


Figure 4 - Analogues aza, thio, sélénio et carbo-jaspine B

Ces modifications du cycle ne semblent pas perturber l'activité de la jaspine B, conduisant à des cytotoxicités comparables à celles du produit naturel. Leur pouvoir inhibiteur de SKs n'a pas été évalué.

L'analogue carboné (**17bis**) présente lui aussi une cytotoxicité comparable à celle de la jaspine B sur les lignées HCT-116, SNU-638, MDA-MB-231, PC-3 et Caki-1, ainsi qu'une activité inhibitrice des SK1 et SK2 identique à celle du DMS.

c) Modifications de la chaîne

Certaines équipes ont travaillé sur la modification de la chaîne latérale de la jaspine B. Les travaux se sont concentrés sur l'incidence de la longueur de la chaîne, l'incidence de différents motifs (triazole, aromatique, insaturation et ω -fonctionnalisation) et l'incidence d'une *N*-fonctionnalisation (alkyle ou acyle) sur leur cytotoxicité ou leur activité d'inhibition de SKs.

Ainsi, N. Fujii et H. Ohno ont travaillé sur la longueur de la chaîne (8 à 14 atomes de carbone) de la 2-*epi*-jaspine B (**8**), composé le plus actif sur l'inhibition des SK.²¹ L'optimum d'inhibition des SKs est atteint pour la chaîne tétradécane (C₁₄H₂₉).

H.M. Liu s'est intéressé à l'influence de la longueur de la chaîne alkyle (de C7 à C18) des jaspines triazole (**18**) et (**19**) sur la cytotoxicité de ces composés. Le composé (**18**) avec une chaîne en C14 et le composé (**19**) avec une chaîne en C18 sont les plus actifs de chaque série. Ils présentent des CI₅₀ comparables à celle de la jaspine B sur les lignées EC-9706, MGC-803 et MCF-7. Il est à noter que l'introduction du motif triazole n'entraîne pas de perte significative de cytotoxicité.¹³

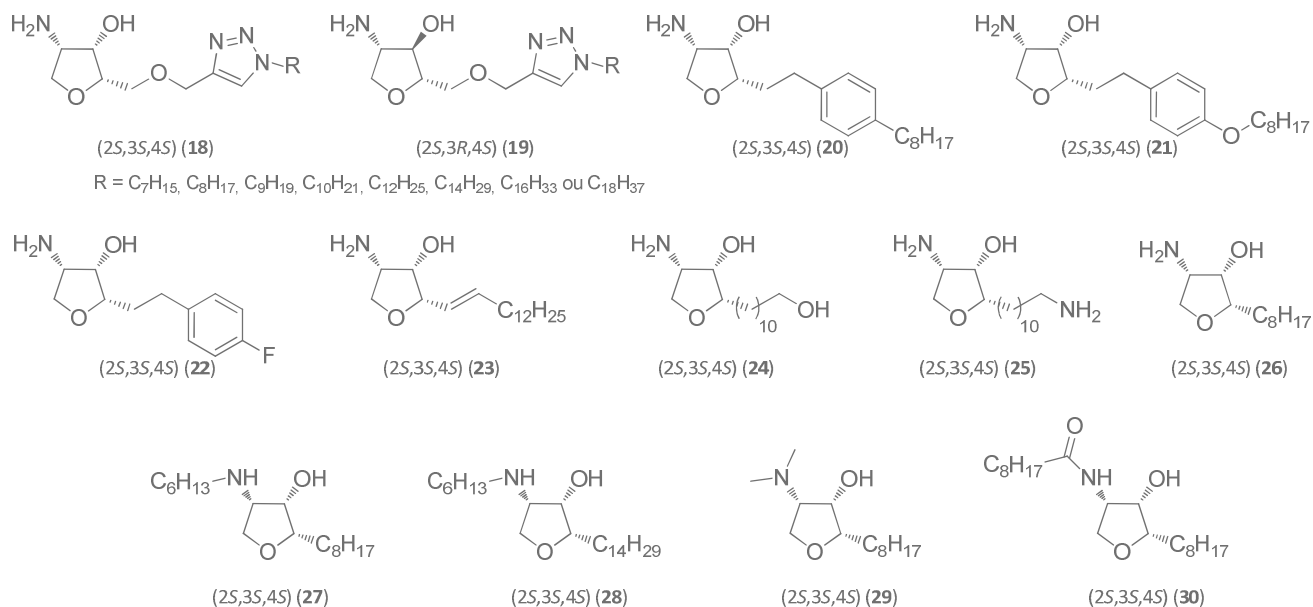


Figure 5- Analogues de la jaspine B avec modification de la chaîne

La cytotoxicité des composés (20) à (30) synthétisés dans l'équipe au cours de la thèse de Y. Salma a été évaluée sur des cellules B-16.^{11, 22, 23}

Ainsi, les composés aromatiques (20) et (21) présentent respectivement une Cl₅₀ d'environ 1μM et 2.2μM alors que le composé (22) n'est pas cytotoxique. La présence d'un noyau aromatique sur la chaîne latérale de la jaspine B n'influence donc pas sa cytotoxicité tant qu'une longueur suffisante de chaîne est maintenue.

L'analogue insaturé de la jaspine B (23) est le meilleur de la série avec une Cl₅₀ de 0.75μM. L'analogue tronqué de la jaspine B ω-hydroxylée (24) n'est pas cytotoxique alors que l'analogue ω-aminé (25) présente une Cl₅₀ de 4μM comparable à (2). L'analogue tronqué (26) possède aussi une cytotoxicité comparable à la jaspine B, avec une Cl₅₀ de 2.5μM.

En revanche, la N-alkylation ou la N-acylation de la jaspine B entraîne une diminution ((27) : Cl₅₀=9μM ; (28) : Cl₅₀=8μM ; (30) : Cl₅₀=10μM) ou une perte totale de cytotoxicité pour le composé (29).

3) Conclusion préliminaire sur l'activité de la jaspine et hypothèses de travail

L'étude des analogues de la jaspine B a permis d'identifier trois paramètres clés dans l'activité cytotoxique de cette molécule :

- la stéréochimie (2S,3S,4S) est requise pour une cytotoxicité optimale.
- la présence d'une amine primaire sur le cycle tétrahydrofurane est essentielle pour le maintien de l'activité.
- la présence d'une chaîne latérale avec une longueur de chaîne suffisante est nécessaire pour l'activité cytotoxique. Les motifs triazole, noyau aromatique ou une amine en position terminale de la chaîne latérale sont tolérés.

De plus, il est possible d'identifier 3 mécanismes à l'origine de la cytotoxicité de la jaspine B, variables selon les lignées cellulaires:

- l'inhibition de l'activité de kinases : SKs, PKCs, Cdk2 et ERK.
- une sur-production de DhCer conduisant à une mort cellulaire par autophagie.
- l'inhibition de la conversion du Cer en SM conduisant à l'accumulation intracellulaire en Cer, qui provoque l'apoptose par voie mitochondriale, essentiellement de façon caspase-dépendante.

Cependant, le mécanisme d'inhibition de la conversion du Cer en SM reste encore à préciser. Bien que l'inhibition de la SMS par la jaspine B ait été suggérée sur la base d'expériences d'inhibition de l'expression du gène codant pour la SMS1, le blocage de l'activité de transport de Cer par la protéine CERT pourrait aussi être à l'origine de l'inhibition de cette conversion. Mes travaux de thèse ont donc visés à répondre à cette hypothèse en développant différents outils :

- une étude d'arrimage moléculaire dans le domaine START de la protéine corrélée à des tests de liaison spécifique au domaine START (cf. Chapitre II).
- l'étude du mode d'action cellulaire de la jaspine B par imagerie de fluorescence grâce à des sondes fluorescentes de la jaspine. Cette partie sera abordée dans la suite de ce chapitre. Ainsi, pour développer ces sondes fluorescentes, les différentes voies d'accès à la jaspine B décrites dans la littérature ont été étudiées.

II. Synthèses de la jaspine B

Au cours des dernières années, la jaspine B a intéressé de nombreuses équipes du fait de son activité cytotoxique significative et sa simplicité structurale. De nombreuses synthèses totales de la jaspine B et de ses analogues ont ainsi été rapportées. Des synthèses à partir d'un précurseur chiral, tel que la *D-ribo*-phytosphingosine (**3**), la *L-lyxo*-phytosphingosine (**31**) et à partir du pool chiral avec des dérivés de la L-sérine (**32**), des dérivés de l'acide tartrique (**33**) et des dérivés carbohydrates ou (*R*)-glycidol (**34**) ont été développées dans un premier temps. Des synthèses asymétriques à partir de précurseurs simples sont apparues par la suite.

1) Synthèses de la jaspine B à partir d'un précurseur chiral

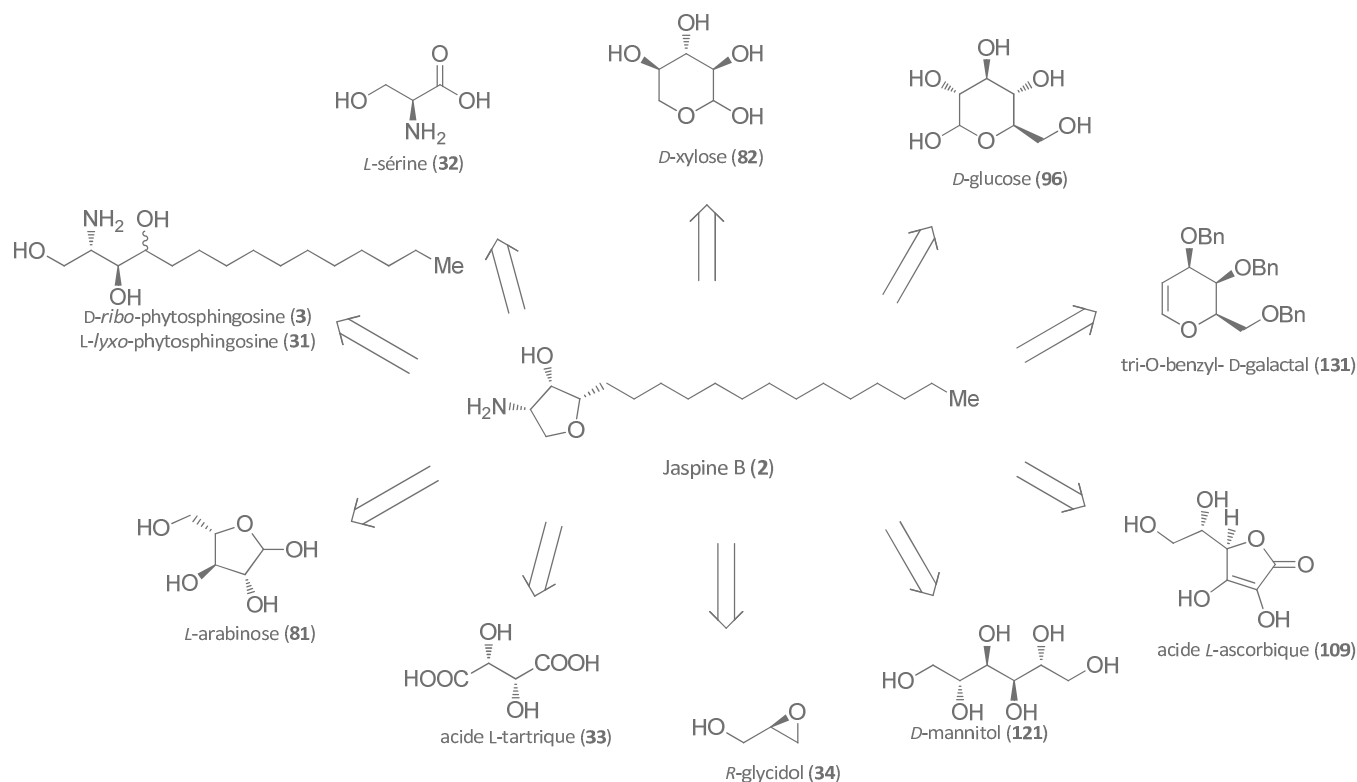


Schéma 1 – Précurseurs issus du pool chiral utilisés dans la synthèse de la jaspine B

a) A partir de phytosphingosine

L'équipe d'H.S. Overkleeft rapporte en premier la synthèse de la jaspine B (2) à partir de (3) en 3 étapes avec un rendement global de 72%, ainsi que de son épimère (6).²⁴ L'azoture (35) est obtenu par la réaction de l'azoture de triflyle sur (3) en présence de sulfate de cuivre. Le traitement de l'azoture (35) par le triméthylorthoacétate (TMOA) et une quantité catalytique de trifluorure de bore diéthyléthérate permet l'accès au composé tétrahydrofurane (36) avec la configuration (2S,3S,4S) souhaitée, via une cyclisation 1,2,*n*-triol décrite par B. Borhan et ses collaborateurs.²⁵ Puis, la réduction suivie de l'hydrolyse de l'azoture (36) permet d'accéder à la jaspine B.

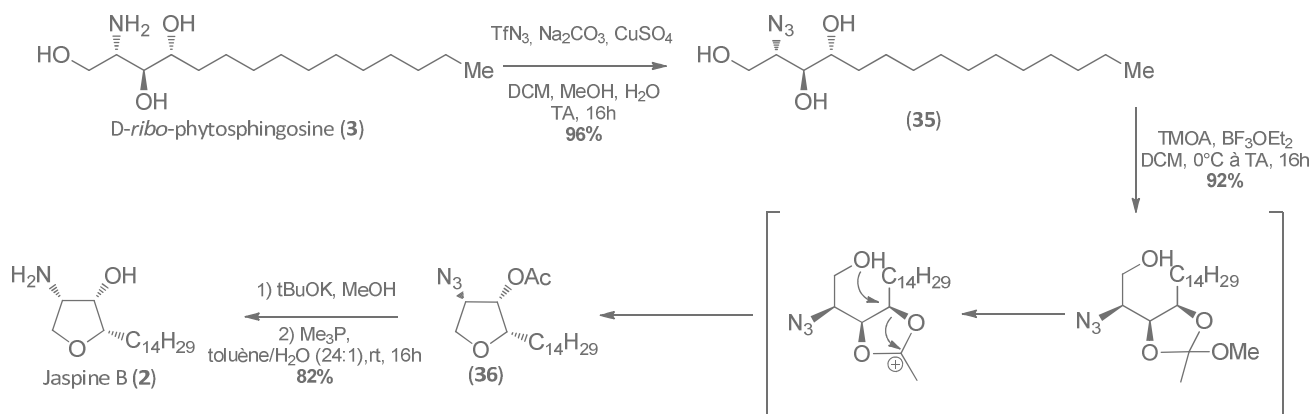


Schéma 2 - Synthèse de la jaspine B (2) à partir de la D-ribo-phytosphingosine (3) selon H.S. Overkleeft

Un an après, S. Kim décrit l'accès à la jaspine B (2) via l'intermédiaire sulfate (37) en 7 étapes avec un rendement global de 60%, ainsi que de son épimère (6).²⁶ La protection successive de l'amine de la D-ribo-phytosphingosine (3) par un azoture, puis de l'alcool primaire par un groupement *tert*-butyldiphénylsilyl permet d'accéder à l'intermédiaire (38). Le traitement de (38) par du chlorure de thionyle, puis l'oxydation de la sulfite cyclique par RuCl₃ et NaIO₄ permet la formation du sulfate (37). La déprotection de l'alcool primaire du sulfate (37), puis l'hydrolyse de l'intermédiaire ester de sulfate conduit à l'analogue azoture de la jaspine B (39) par cyclisation 5-*endo*-tet. L'azoture (39) est ensuite réduit en amine pour fournir la jaspine B (2).

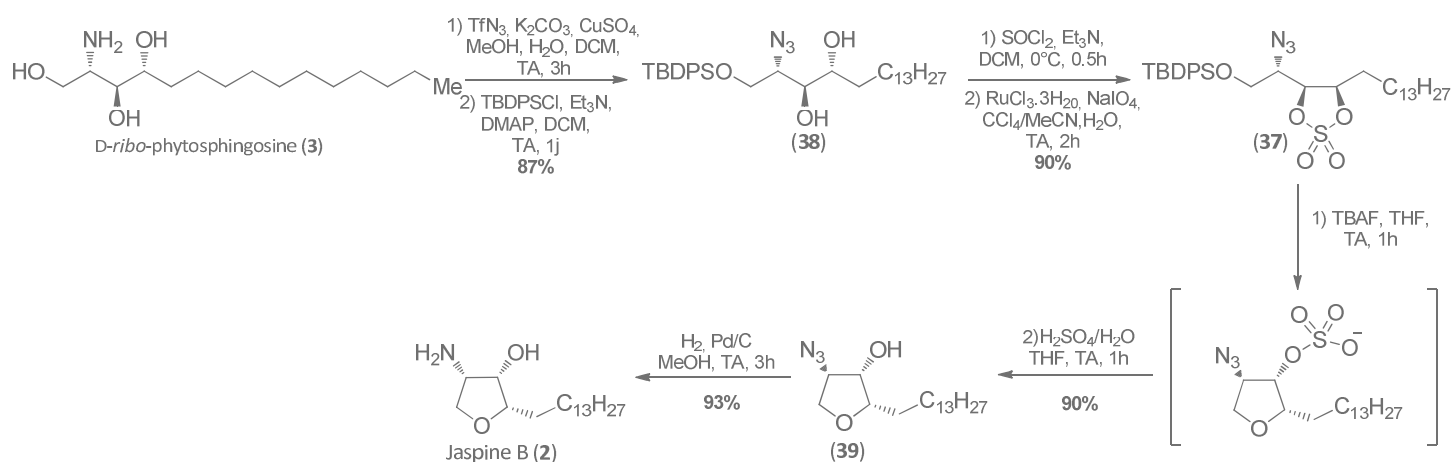
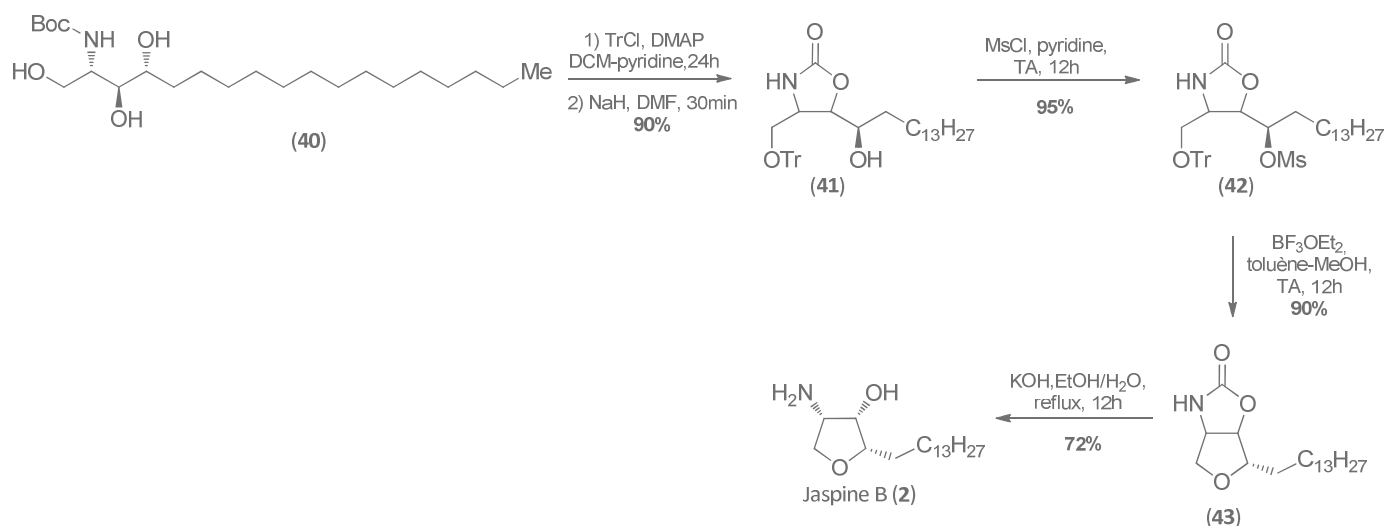
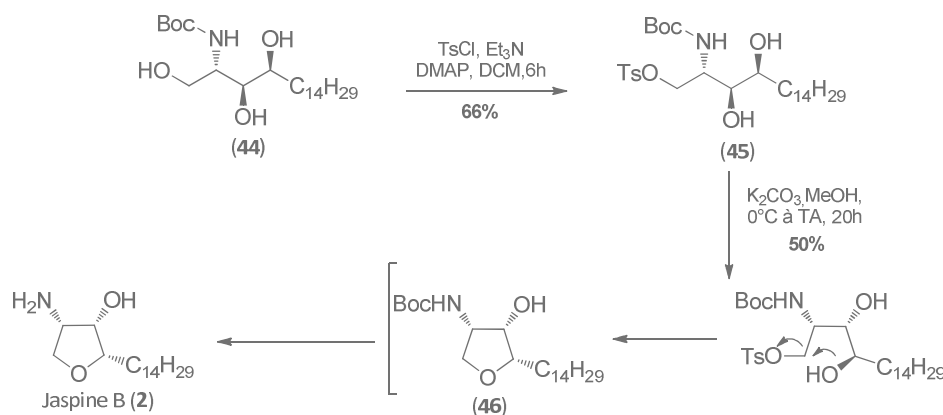


Schéma 3 - Synthèse de la jaspine B (2) à partir de la D-ribo-phytosphingosine (3) selon S. Kim

En 2012, cette même équipe décrit une nouvelle synthèse de la jaspine B (2) à partir de la *N*-Boc-D-ribo-phytosphingosine (40).²⁷ Cette synthèse en 5 étapes débute par la protection de l'alcool primaire par un éther de trityle puis la formation de l'oxazolidinone (41).¹⁴ La méthylation de (41), puis la déprotection de l'alcool primaire de (42) suivie d'une cyclisation intramoléculaire spontanée permet la formation de l'intermédiaire (43). Enfin, l'ouverture de l'oxazolidinone (43) conduit à la jaspine B avec un rendement global de 55%.



Une autre voie d'accès à la jaspine B à partir de la *N*-Boc-*L*-lyxo-phytosphingosine (44) a été décrite par A. Delgado en 2009 avec un rendement global de 24% sur 3 étapes.²⁸ La tosylation de l'alcool primaire puis le traitement de l'intermédiaire (45) en milieu basique conduit au composé cyclisé (46). Enfin la déprotection de l'amine avec l'acide trifluoroacétique (TFA) permet d'accéder à la jaspine B.



b) A partir de la L-sérine

De nombreuses synthèses de la jaspine B ont été décrites à partir de l'aldéhyde de Garner (47) dérivant de la L-sérine (32).

L'équipe de B.V Rao décrit en premier la synthèse de la jaspine B à partir de l'aldéhyde de Garner.²⁹ Le traitement de (47) avec du bromure de vinylmagnésium conduit à la formation stéréosélective des alcools vinyliques (48a) et (48b) séparables par chromatographie. La protection de l'alcool secondaire de (48a), la coupure oxydante de la double liaison puis l'addition de Grignard sur l'intermédiaire aldéhyde conduisent à un mélange de diastéréoisomères inséparables (49). L'hydrolyse des acétonides, puis le traitement des diastéréoisomères (50) par du chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMSCl) permettent d'accéder aux composés (51). La méthylation de l'alcool secondaire et la

déprotection de l'alcool primaire conduisent spontanément aux composés cycliques (**52a**) et (**52b**) séparables par chromatographie. Les fonctions alcool et amine de (**52a**) sont successivement déprotégées pour donner la jaspine B sous forme de sel de TFA.

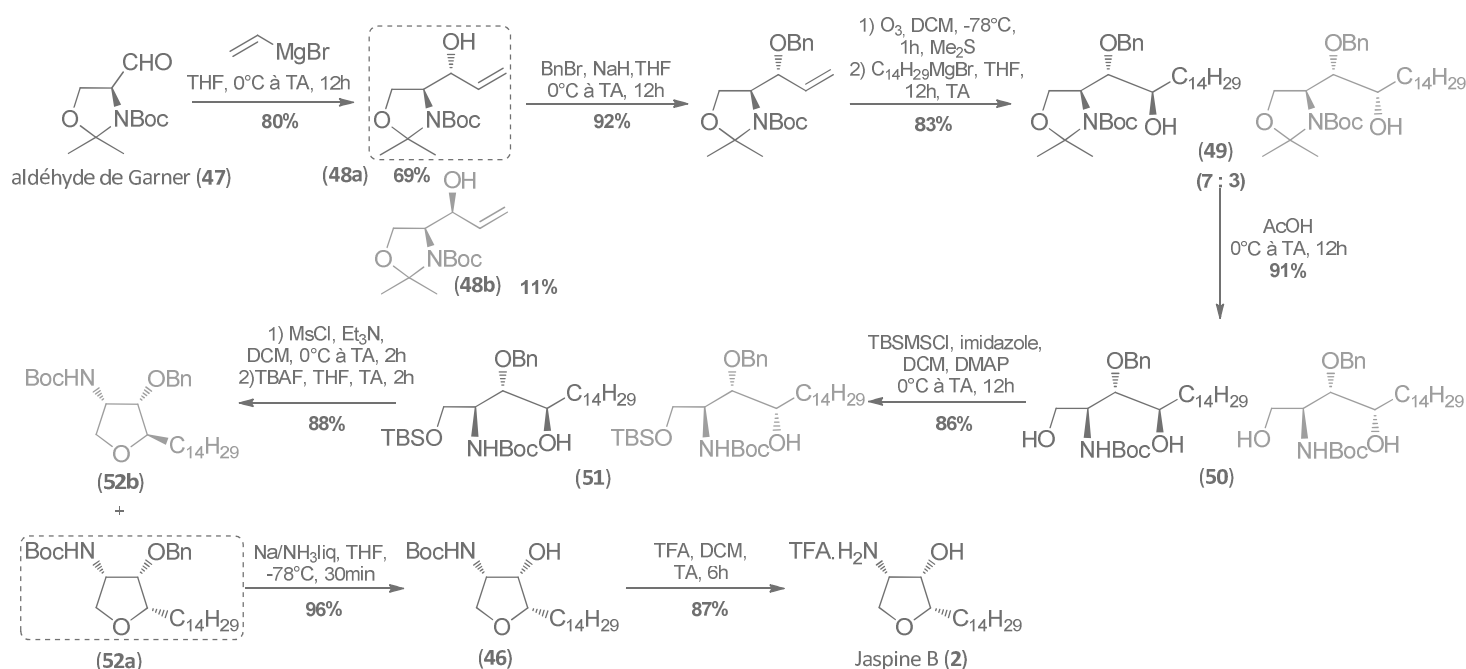
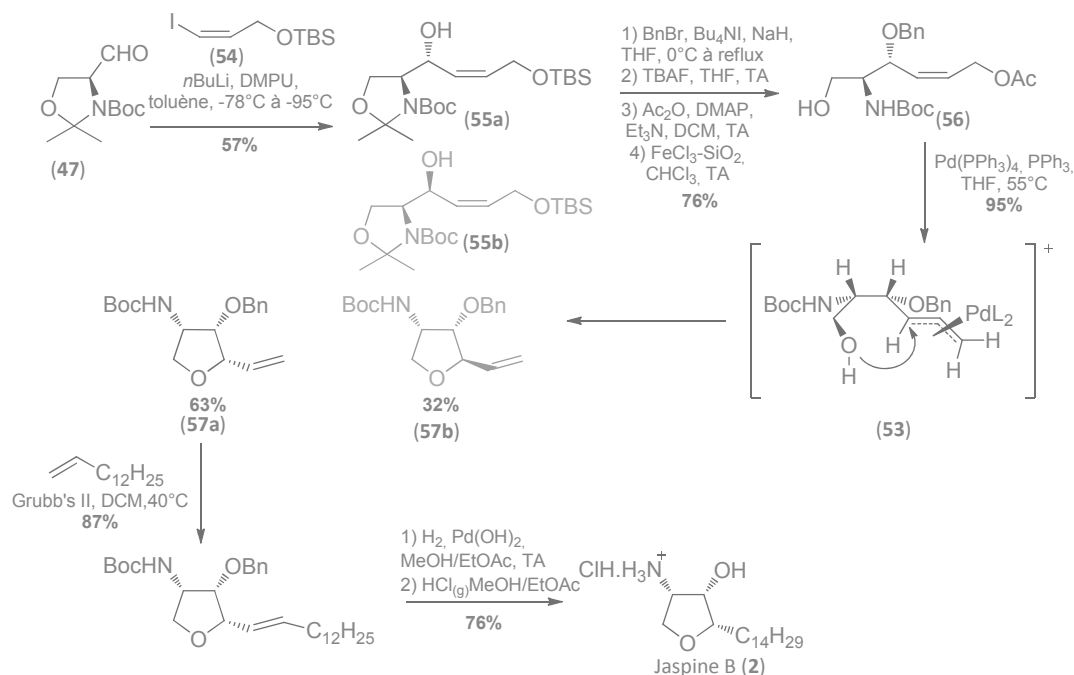


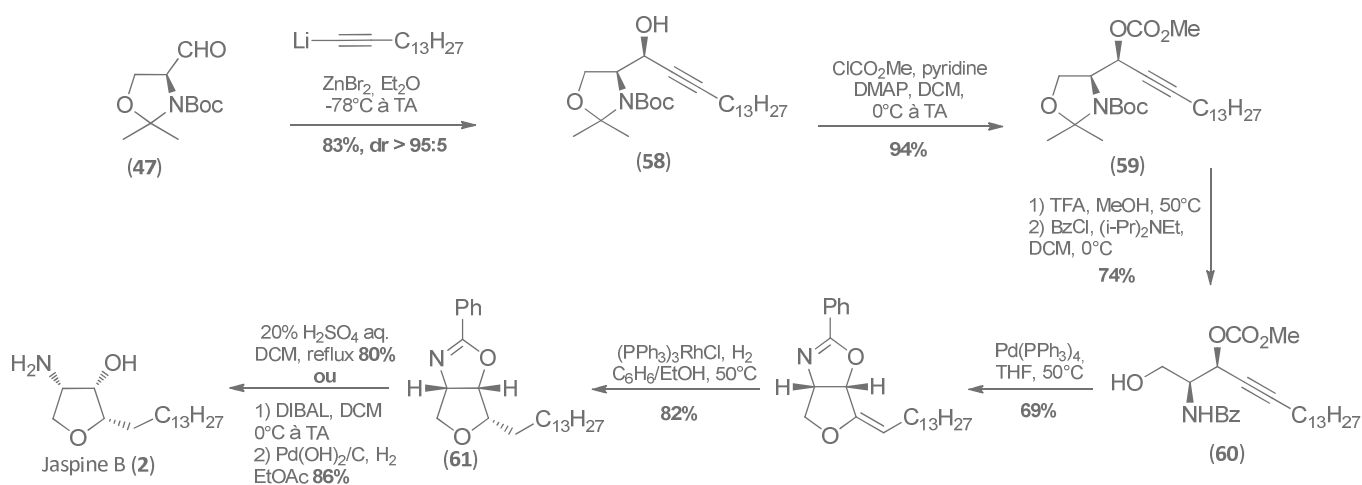
Schéma 6 - Synthèse de la jaspine B (**2**) à partir de l'aldéhyde de Garner (**47**) selon B.V. Rao

A.M. Koskinen rapporte la formation de la jaspine B via un intermédiaire η^3 -allylpalladium (**53**).^{30, 31} L'aldéhyde de Garner (**47**) est mis en réaction avec le composé iodé (**54**) en présence de *n*-butyllithium et DMPU produisant un mélange de diastéréoisomères (**55a**) et (**55b**) séparables par chromatographie. La benzylation de l'alcool secondaire, la désilylation et l'acylation de l'alcool primaire puis l'hydrolyse du *N,O*-acétal sur le composé (**55a**) conduisent à l'intermédiaire (**56**). L'acétate allylique (**56**) est traité par $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, conduisant aux diastéréoisomères séparables (**57a**) et (**57b**) par cyclisation intramoléculaire via l'intermédiaire (**53**). La métathèse croisée, puis les déprotections successives des fonctions alcool et amine conduisent à la jaspine B avec un rendement global de 14% sur 9 étapes.



En 2009, N. Fujii et H. Ohno synthétisent la jaspine B en 11 étapes via une bis-cyclisation de bromoallène catalysée au palladium, avec un rendement global de 11%.³²

En 2010, ils proposent une amélioration de leur précédente synthèse. La jaspine B est alors obtenue en 7 ou 8 étapes avec un rendement global respectif de 26% ou 28%.³³ L'addition diastéréosélective du 1-pentadécynyllithium sur (47) conduit à la formation de l'alkynol (58). Le carbonate (59) est obtenu après traitement de (58) par du chloroformiate de méthyle en présence de pyridine et DMAP. L'hydrolyse de l'acétal au TFA et l'acylation de l'amine avec du chlorure de benzyle permettent d'obtenir la benzamide (60). L'ajout de $\text{Pd(PPh}_3)_4$, puis l'hydrogénation donne le composé bicyclique (61). Le clivage de l'oxazoline en conditions acides fortes conduit directement à (2). L'ouverture de (61) par le DIBAL puis l'hydrogénolyse du groupement benzyle mène à la jaspine B dans des conditions plus douces avec un meilleur rendement.



Dans le même temps, ils proposent une synthèse stéréosélective, donnant accès à la jaspine B en 5 étapes avec un rendement global de 40%, ainsi qu'à ses épimères (**4**), (**5**) et (**6**).³⁴ Cette synthèse fait intervenir un dérivé de la *N*-Boc- *D*-ribo-phytosphingosine obtenu à partir de l'aldéhyde de Garner (**47**).

En 2013, cette même équipe présente une nouvelle synthèse de la jaspine B en 7 étapes avec un rendement de 26% à partir de (**47**). Les étapes clés de cette synthèse sont l'acétoxyallytion catalysée à l'indium et l'introduction tardive de la chaîne alkyle par métathèse croisée.³⁵

En 2013, A.K Shaw³⁶ et G. Panda³⁷ publient deux synthèses de la jaspine B en 8 étapes basées sur l'iodocyclisation. A. K. Shaw décrit l'introduction précoce de la chaîne alkyle par métathèse croisée sur l'alcool vinylique protégé (**62**), suivie de l'iodocyclisation donnant les diastéréoisomères (**63a**) et (**63b**) séparables par chromatographie. La déiodination de (**63a**), puis les déprotections successives permettent d'obtenir la jaspine B avec un rendement global de 32%.

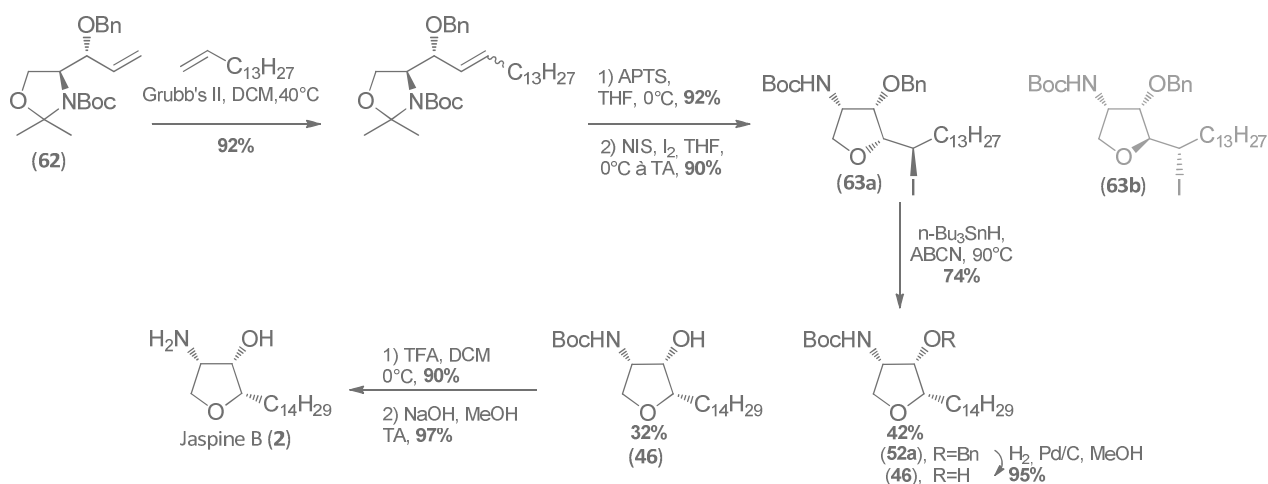


Schéma 9 - Synthèse de la jaspine B (**2**) à partir de l'aldéhyde de Garner (**47**) selon A.K. Shaw

G. Panda présente une iodocyclisation sur l'alcool allylique (**64**) avant d'introduire la chaîne tardivement par métathèse croisée. L'hydrogénation du produit de métathèse (**65**), puis les déprotections simultanées permettent d'obtenir la jaspine B avec un rendement global de 29%.

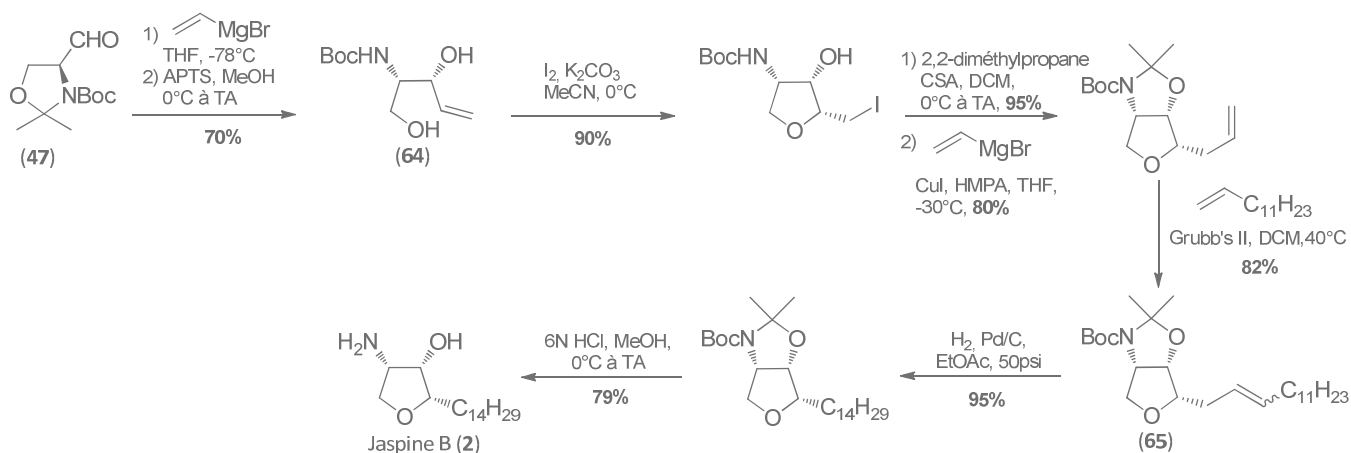
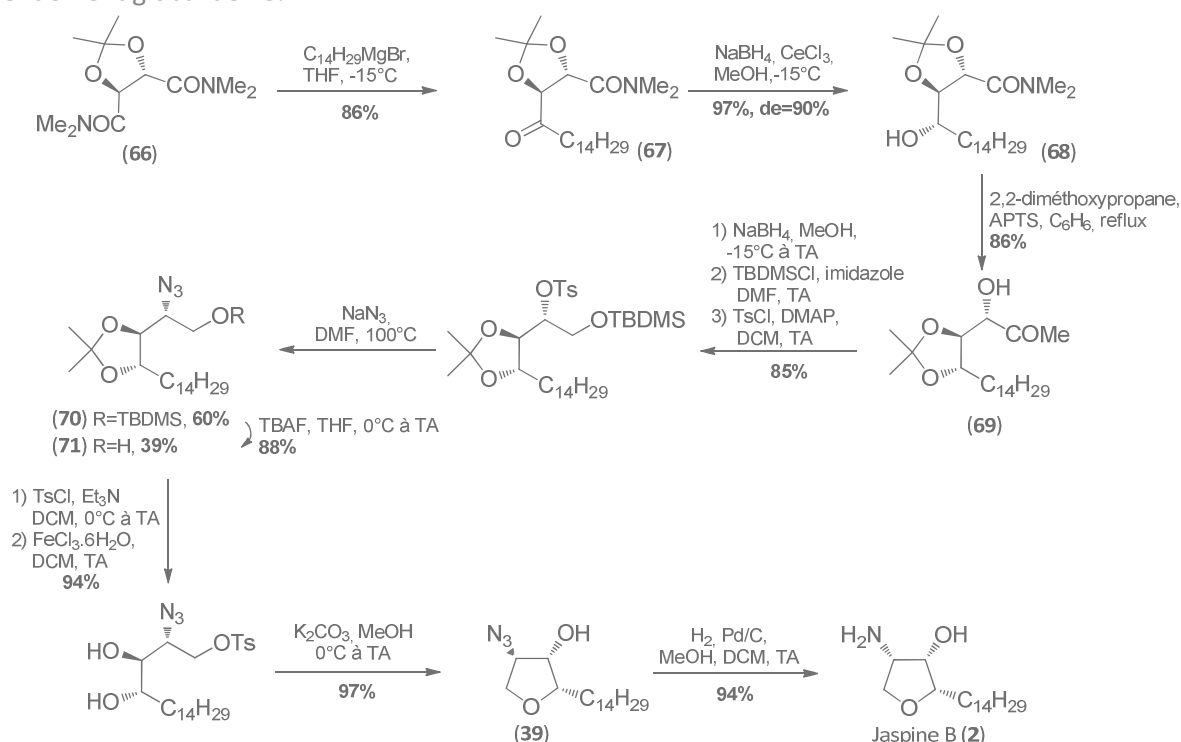


Schéma 10 - Synthèse de la jaspine B (**2**) à partir de l'aldéhyde de Garner (**47**) selon G. Panda

c) A partir de l'acide tartrique

K. R. Prasad décrit en 2007 la synthèse de la jaspine B en 12 étapes à partir d'un dérivé bis-amide de l'acide D-tartrique (**66**).³⁸ Le traitement de (**66**) avec du bromure de tétradécylmagnésium mène au composé (**67**). Après réduction diastéréosélective de (**67**) dans les conditions de Luche, l'ajout d'acide *para*-toluènesulfonique (APTS) et de 2,2-diméthoxypropane sur (**68**) permet la migration de l'acétonide pour donner l'intermédiaire (**69**). Après réduction de l'ester et protection de l'alcool primaire ainsi généré, l'insertion de l'azoture sur l'alcool secondaire activé sous la forme d'un groupement tosylate donne les produits (**70**) et (**71**), issu d'une désilylation partielle de (**70**). La tosylation de l'alcool primaire de (**71**), l'hydrolyse de l'acétonide en conditions acides puis le traitement par du K₂CO₃ permettent la formation du cycle tétrahydrofurane par substitution nucléophile intramoléculaire. Enfin, la réduction de l'azoture (**39**) conduit à la jaspine B avec un rendement global de 48%.

Schéma 11 - Synthèse de la jaspine B (**2**) à partir d'un dérivé bis-amide de l'acide D-tartrique (**66**) selon K.R. Prasad

L'équipe d'Y. Ichikawa décrit par la suite une synthèse en 19 étapes de la jaspine B à partir d'un dérivé de l'acide L-tartrique (**72**) basé sur un réarrangement [3.3] sigmatropique d'un allyl-cyanate.³⁹ L'insertion de la chaîne est réalisée par réaction du 1-tridécynyl de lithium sur (**72**) préalablement activé sous forme de triflate. L'hydrogénation de la triple liaison puis la désilylation donnent l'intermédiaire (**73**). L'aldéhyde α,β -insaturée (**74**) est obtenue par oxydation de Swern, oléfaction d'Horner-Wadsworth-Emmons, réduction de l'ester en alcool puis son oxydation par le système 4-acétamido-TEMP/NCS. Le traitement de (**74**) par Et₂Zn en présence de 3-exo-morpholinoisoborneol ((-)-MIB) permet la formation énantiosélective de l'alcool allylique (**75**). L'ajout d'isocyanate trichloroacétyl sur l'alcool puis l'hydrolyse par K₂CO₃ permettent la formation du carbamate (**76**). Le produit de déshydratation de (**76**) par la triphénylphosphine et le bromure de carbone en présence de triéthylamine subit un réarrangement spontané pour donner l'intermédiaire allyl-isocyanate (**77**). L'ajout de méthanol en présence de maléate de dibutylétain permet d'isoler le méthylcarbamate (**78**). La déprotection de l'acétonide puis le traitement à l'hydruide de sodium donnent accès à

l'oxazolidinone (**79**). L'ozonolyse de l'alcène mène au lactol (**80**). La réduction de ce lactol nécessite son acétylation préalable pour donner le produit de réduction (**43**). Le clivage de l'oxazolidinone (**43**) par saponification conduit à la jaspine B avec un rendement global de 8%.

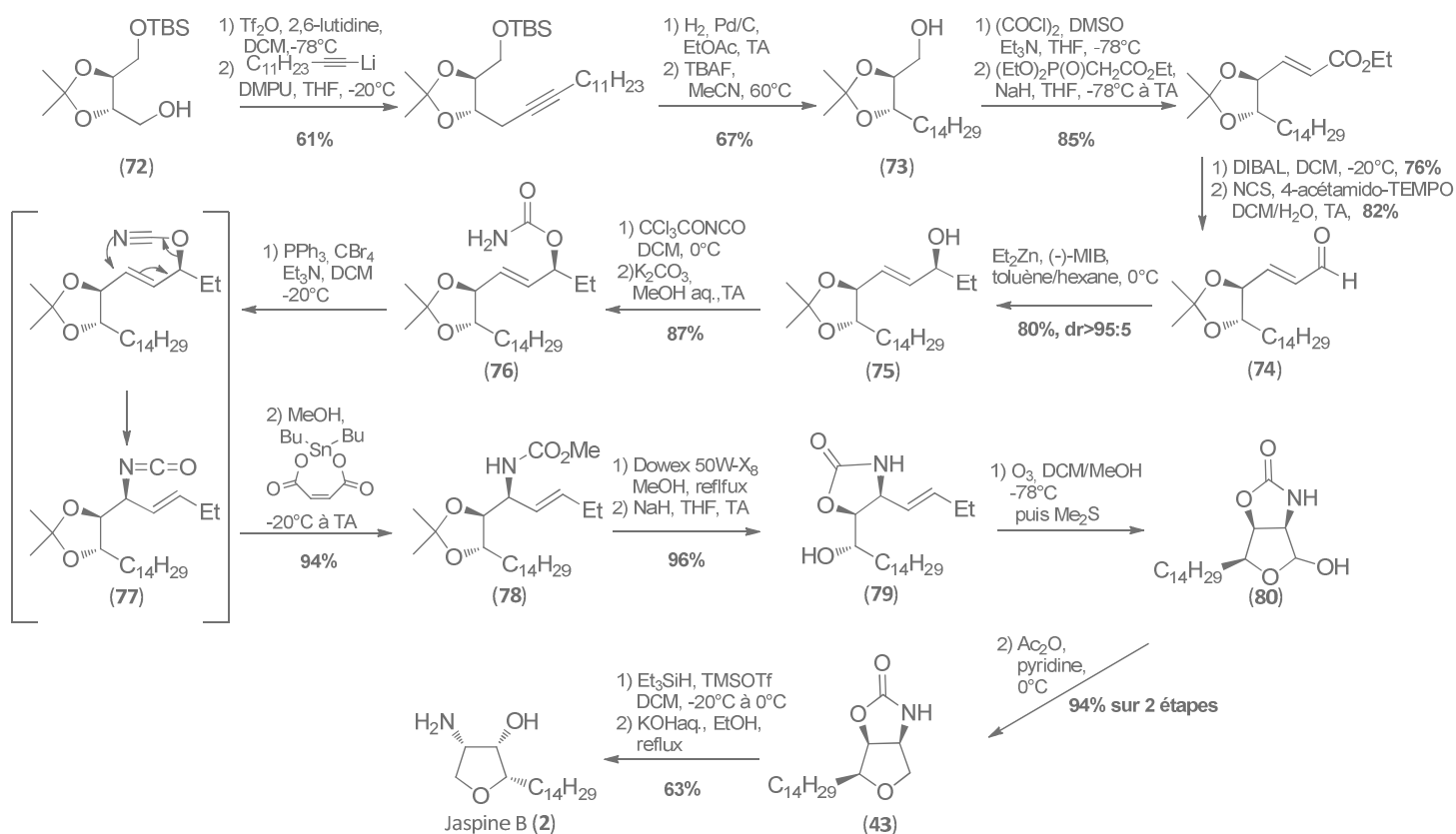
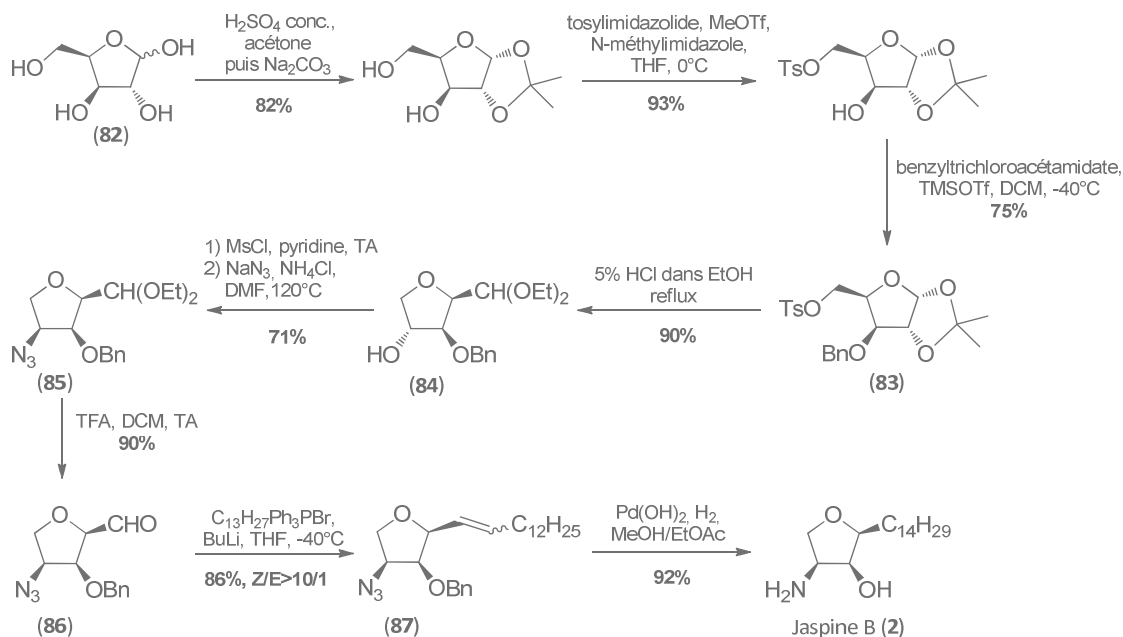


Schéma 12 - Synthèse de la jaspine B (**2**) à partir d'un de l'acide L-tartrique (**72**) selon Y. Ichikawa

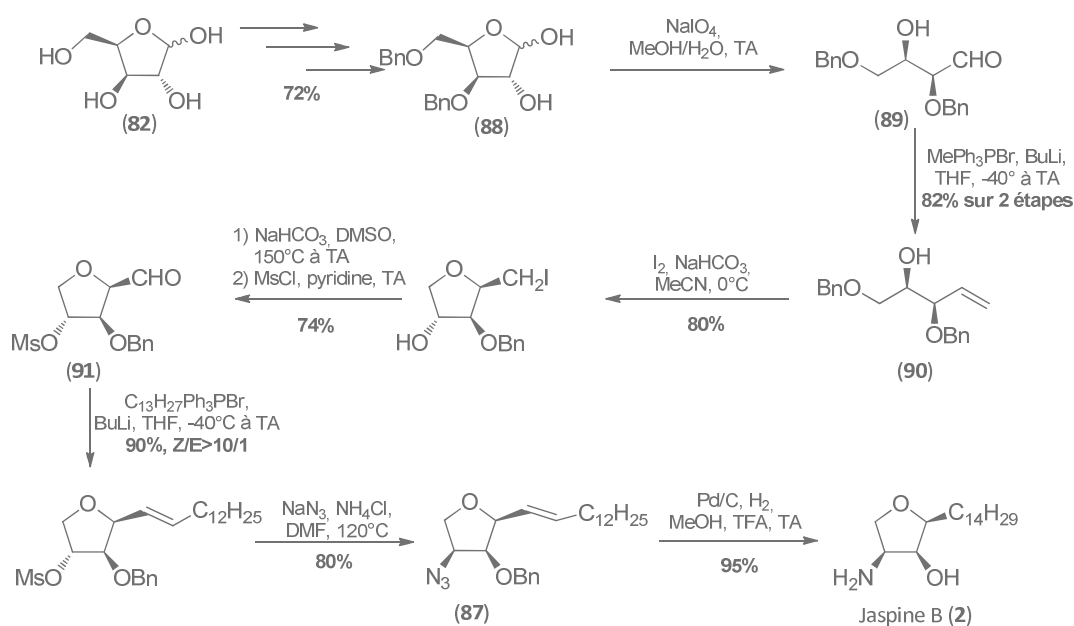
Une nouvelle voie d'accès similaire, à partir du L-tartrate de diméthyle ou du L-arabinose (**81**) a récemment été décrite par M. Martinkova et ses collaborateurs.⁴⁰ Cette synthèse, basée sur un réarrangement [3.3] sigmatropique, permet d'accéder à la jaspine B en 19 ou 26 étapes avec des rendements globaux de 3% ou 2%.

d) A partir de carbohydrates et dérivés carbohydrates

Y. Du et J. Linhardt rapportent en 2006 une synthèse de la jaspine B en 10 étapes à partir du D-xylose (**82**).⁴¹ Cette synthèse débute par la formation du 1,2-acétal, puis protection régiosélective de l'alcool primaire avec un groupement tosylo, puis la protection de l'alcool secondaire avec un groupement benzyle pour donner l'intermédiaire (**83**). L'hydrolyse acide de l'acétal dans l'éthanol conduit au réarrangement du cycle furane pour obtenir le composé (**84**). L'insertion de l'azoture sur (**84**) préalablement activé par mésylation, puis la déprotection de la fonction aldéhyde de (**85**) donne le carbaldéhyde (**86**). L'introduction de la chaîne alkyle est réalisée par oléfination de Wittig. La jaspine B est alors obtenue par hydrogénation de (**87**) avec un rendement global de 26%.



Peu de temps après, Y. Du communique une alternative de synthèse de la jaspine B à partir du D-xylose (82).⁴² L'aménagement des groupements protecteurs via formation d'acétal, benzylation et déprotection de l'acétal est réalisé pour donner le diol (88). La coupure oxydante de (88) par du periodate de sodium fournit l'aldéhyde (89) qui est engagé dans une réaction de Wittig aboutissant au composé (90). Le traitement de (90) par l'iode et NaHCO₃ entraîne la débenzylation et la cyclisation du cycle furane induite par le diiode. L'ajout de diméthylsulfoxyde, puis du chlorure de mésyle en présence de pyridine permet la formation du carbaldéhyde (91). Enfin, l'oléfination de Wittig et la substitution du mésylate par l'azoture conduisent au composé (87), qui après hydrogénolyse donne accès à la jaspine B en 11 étapes avec un rendement global de 24%.



En 2012, H.M. Liu décrit une nouvelle voie de synthèse en 9 étapes de la jaspine B à partir du D-xylose (**82**).⁴³ De façon similaire à la première synthèse de Y. Du, l'époxide (**92**) est obtenu par hydrolyse acide de l'acétal dans le méthanol conduisant au réarrangement du cycle furane et à la génération de l'époxide. Le traitement de (**92**) par l'azoture de sodium permet l'obtention de l'azido-alcool (**93**). L'oxydation, puis la réduction stéréosélective conduisent à un mélange de diastéréoisomères (**94a**) et (**94b**), séparables après benzylation de l'alcool. La déprotection de l'acétal (**95**) donne le carbaldéhyde (**86**), qui est engagé dans une oléfinatation de Wittig puis hydrogénation pour donner la jaspine B avec un rendement global de 35%.

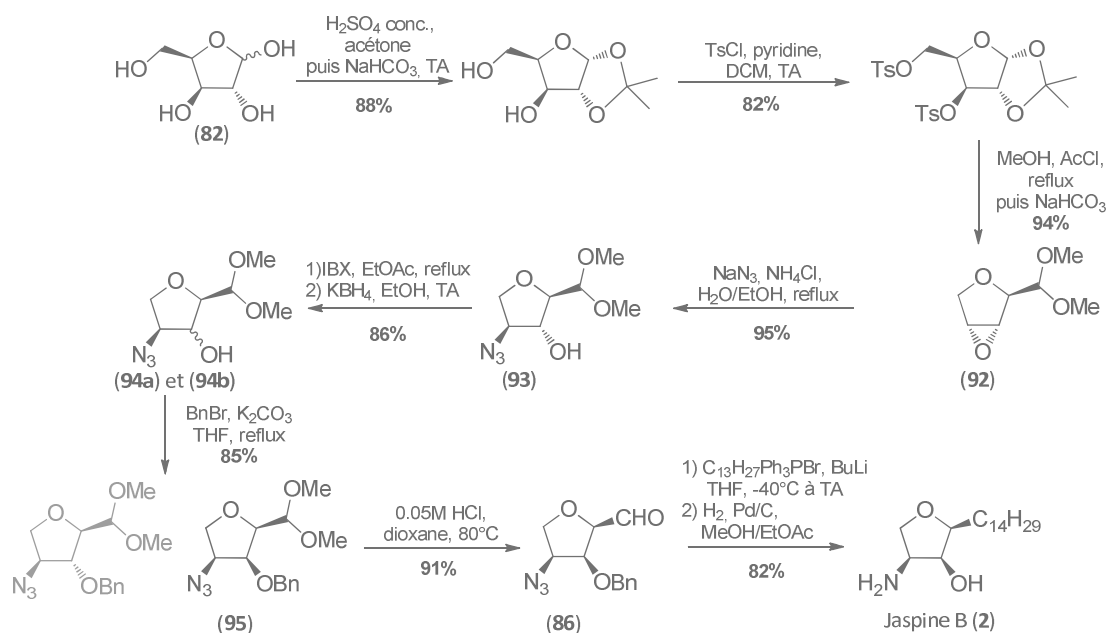


Schéma 15 - Synthèse de la jaspine B (**2**) à partir du D-xylose (**82**) selon H.M. Liu

C. V. Ramana rapporte en 2007 une synthèse de la jaspine B et de son énantiomère, à partir du D-glucose (**96**).⁴⁴ Cette synthèse reste similaire à celle de Y. Du et J. Linhardt, notamment par l'utilisation du même intermédiaire de synthèse (**83**). L'aldéhyde (**97**) dérivant du D-glucose est réduit en présence de NaBH_4 pour donner l'alcool primaire (**98**). Après activation de l'alcool par un groupement tosyle, le cycle furane (**84**) subit un réarrangement catalysé à l'APTS pour donner le composé (**99**). L'ajout d'acide conduit à l'hydrolyse de l'acétal (**99**) en aldéhyde (**100**), engagé dans une réaction d'homologation de Bestmann-Oshira pour donner l'alcyne (**101**). L'azoture (**102**) est obtenu après traitement de (**101**) par l'anhydride triflique puis azoture de lithium. L'insertion de la chaîne est réalisé par alkylation de l'alcyne en position terminale, puis l'alcyne (**103**) est hydrogéné pour fournir la jaspine B avec un rendement global de 12% sur 9 étapes.

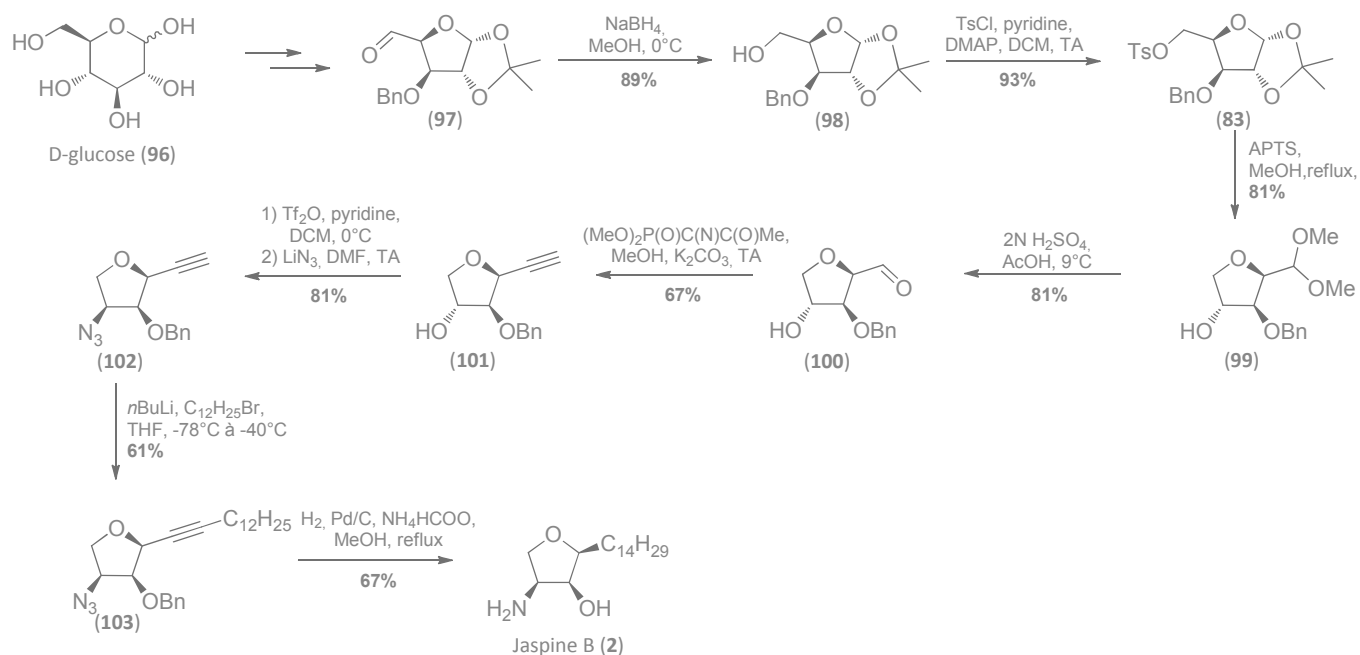


Schéma 16 - Synthèse de la jaspine B (2) à partir du D-glucose (96) selon C.V. Ramana

H.U. Reissig décrit lui aussi une synthèse de la jaspine B et de son diastéréoisomère (10) à partir d'un dérivé du D-glucose utilisé comme auxiliaire chiral, l'alkoxyallène diacétoneglucose (104).⁴⁵ Cette synthèse peu stéréosélective débute par le traitement de (104) par du *n*-butyllithium puis pentadécanal qui donne un mélange diastéréoisomérique d'alcools alléniques (105a) et (105b). La catalyse à l'or de ces alcools alléniques permet leur cyclisation 5-*endo* pour donner un mélange de diastéréoisomères dihydrofuranes (106a) et (106b) séparables par chromatographie. L'insertion de l'azoture sur (106b) nécessite une bromation préalable. La réduction sélective par la L-sélectride conduit à un mélange de diastéréoisomères (107a) et (39). La protection de ce mélange par un groupement carboxybenzyle permet la séparation des diastéréoisomères (108a) et (108b). La jaspine B et son diastéréoisomère (10) sont ensuite obtenus par hydrogénation de (108b) et (108a) avec des rendements globaux de 1% et 3% respectivement sur 7 étapes.

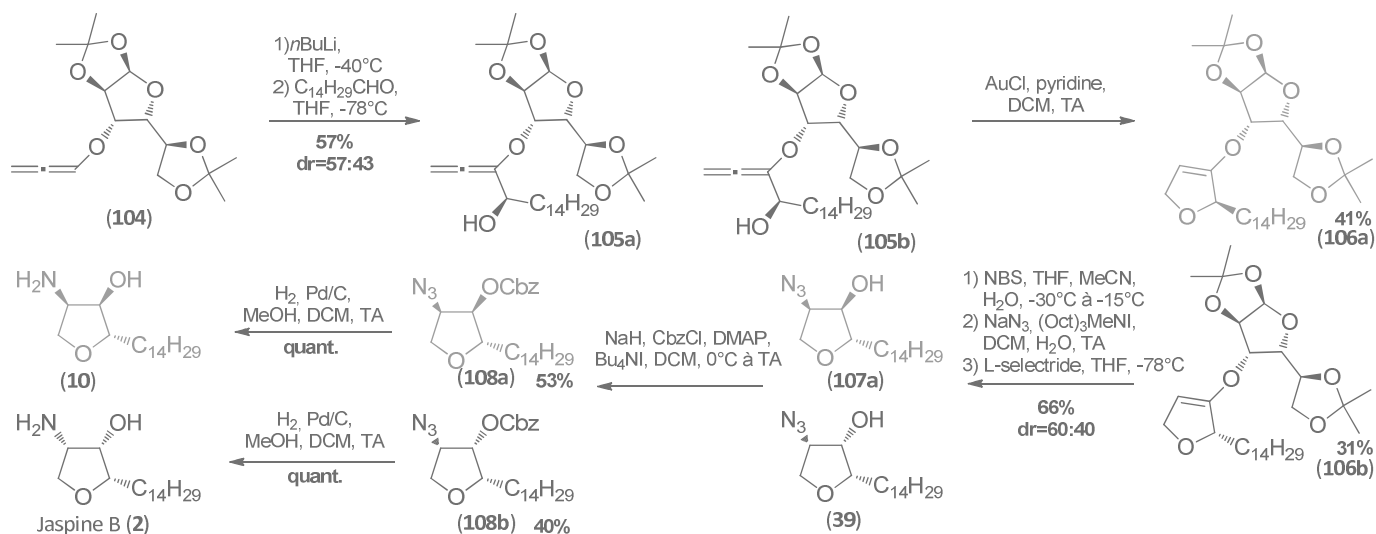


Schéma 17 - Synthèse de la jaspine B (2) à partir du dérivé du D-glucose (104) selon H.U. Reissig

D'autres carbohydrates ou dérivés carbohydrates que le D-glucose ou L-xylose ont été utilisés pour accéder à la jaspine B.

Ainsi, B. V. Rao rapporte une synthèse à partir de l'acide L-ascorbique (**109**).⁴⁶ L'époxide (**110**) est obtenu via la formation de l'acétal sur (**109**) puis clivage oxydant, estérification, réduction en alcool, tosylation de l'alcool primaire et traitement basique.⁴⁷ L'époxide (**110**) est ensuite ouvert régiosélectivement par le bromure de tridécanylmagnésium en présence du cyanure de cuivre pour donner le composé (**111**). L'acétal est ensuite hydrolysé donnant le triol (**112**) qui après protection de l'alcool primaire fournit le diol (**113**). Le traitement de (**113**) par le 2,2-diméthoxypropane en présence d'APTS conduit à l'acétal (**114**), puis la déprotection de l'éther silylé mène à l'alcool (**115**). La succession de l'oxydation de Swern sur (**115**), la condensation avec la benzylamine puis le traitement avec le bromure de vinylmagnésium donnent l'alcène (**116**). Après formation du carbamate (**117**), la coupure oxydante puis la réduction de l'aldéhyde par NaBH₄ fournissent l'alcool (**118**). L'hydrogénation de (**118**) puis le traitement par (Boc)₂O en présence de triéthylamine donnent le composé (**119**). La méthylation puis déprotection de l'acétal conduisent à la formation du cycle furane (**46**). Enfin, la déprotection de l'amine donne la jaspine B avec un rendement global de 13% sur 22 étapes.

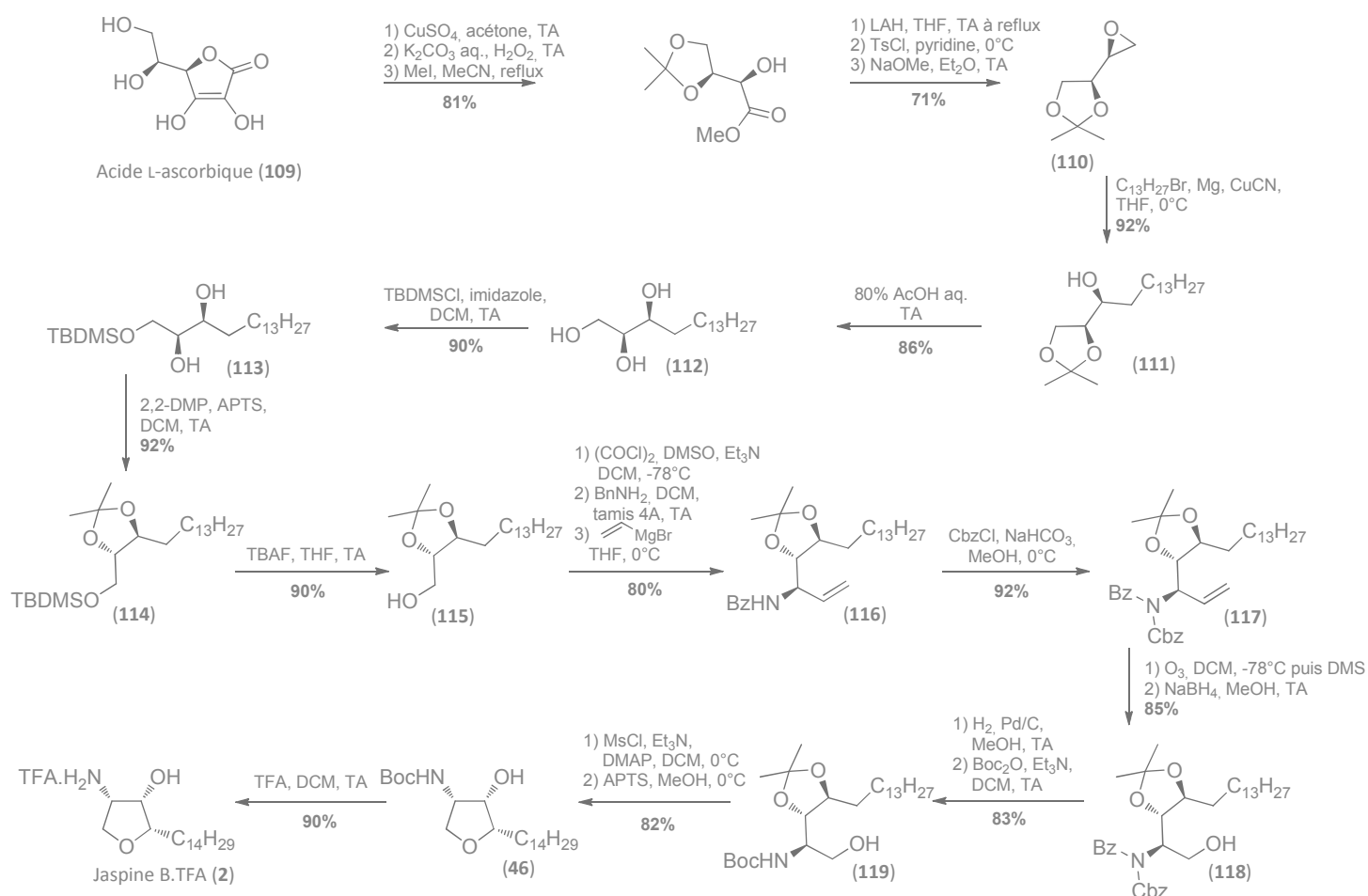
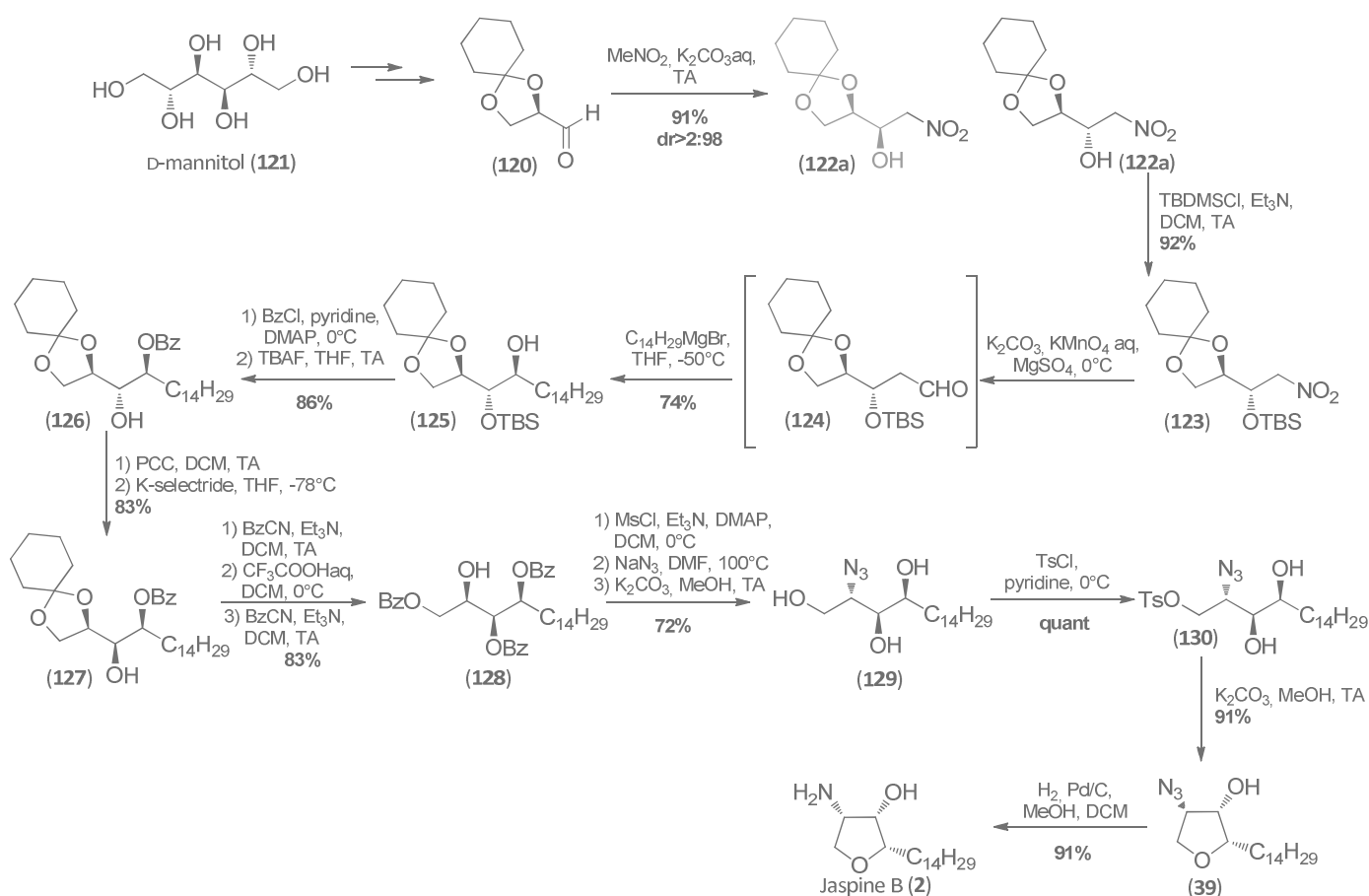


Schéma 18 - Synthèse de la jaspine B (**2**) à partir de l'acide L-ascorbique (**109**) selon B.V. Rao

L'acétal du D-glycéraldéhyde (**120**) dérivant du D-mannitol (**121**)⁴⁸ a été utilisé par A. Chattopadhyay et ses collaborateurs pour accéder à la jaspine B en 17 étapes avec un rendement global de 20%.⁴⁹

L'acétal du D-glycéraldéhyde (**120**) est traité par du nitrométhane en présence de K_2CO_3 pour donner un mélange de diastéréoisomères (**122a**) et (**122b**) séparables par chromatographie. L'alcool secondaire majoritaire (**122b**) est alors protégé par un silyl éther, puis (**123**) engagé dans une réaction de Nef pour donner l'aldéhyde (**124**) instable, directement traité par le réactif de Grignard fournissant l'alcool (**125**). La benzylation puis désilylation de (**125**) mènent à l'alcool (**126**). La stéréochimie du C-3 est inversée par la succession de l'oxydation et réduction diastéréosélective, donnant l'alcool (**127**). La benzylation de (**127**), l'hydrolyse acide de l'acétal, puis la benzylation de l'alcool primaire conduisent au composé (**128**). L'alcool (**128**) est alors mésylé, substitué par un azoture puis les groupements benzyles sont hydrolysés pour donner le triol (**129**). La tosylation de l'alcool primaire, puis la cyclisation intramoléculaire de (**130**) en présence de K_2CO_3 fournissent l'azoture (**39**) qui après hydrogénation donne la jaspine B.

Schéma 19 - Synthèse de la jaspine B (**2**) à partir du D-mannitol (**121**) selon A. Chattopadhyay

En 2007, A.K. Shaw décrit la synthèse de la jaspine B en 8 étapes à partir du tri-*O*-benzyl-D-galactal (**131**).⁵⁰ L'hydrolyse de ce carbohydrate dans les conditions de Perlin conduit à l'aldéhyde α,β -insaturée (**132**), qui après réduction de Luche donne l'alcool allylique (**133**). L'engagement de (**133**) dans une époxidation de Sharpless mène au diol (**134**) via l'ouverture intramoléculaire de l'époxide, puis la protection du diol simultanée donne le composé (**135**). La mésylation de l'alcool, puis substitution du mésylate par l'azoture permet l'insertion de l'amine avec la stéréochimie désirée. L'hydrolyse de l'acétal (**136**) et l'oxydation simultanée par l'acide orthopériodique conduit à l'aldéhyde (**86**) commun à la synthèse de Y. Du.⁴¹ De façon similaire, la chaîne alkyle est introduite

par oléfination de Wittig, puis l'hydrogénation en présence de formiate d'ammonium mène à la jaspine B avec un rendement global de 11%.

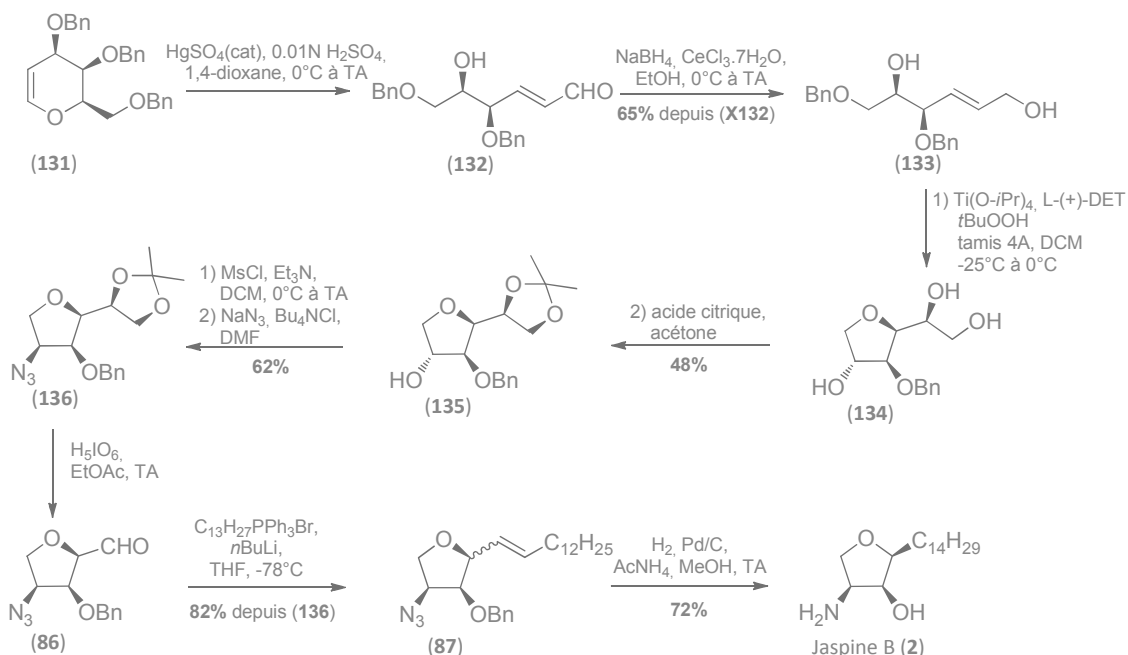


Schéma 20 - Synthèse de la jaspine B (2) à partir du tri-O-benzyl-D-galactal (131) selon A.K. Shaw

J. A. Marco obtient la jaspine B en 2006, à partir du (*R*)-glycidol (**34**).⁵¹ L'ouverture de l'époxide par un organocuprate permet l'insertion de la chaîne alkyle sur le dérivé éther silyl (**137**) du (*R*)-glycidol. La protection de l'alcool secondaire résultant (**138**) puis la désilylation conduisent au composé (**139**). L'ester α,β -insaturé (**140**) est obtenu par oxydation de Swern puis oléfination de l'aldéhyde intermédiaire. L'ester est ensuite réduit au DIBAL puis l'alcool allylique résultant est soumis à l'époxydation de Sharpless pour donner l'époxyalcool (**141**). Après traitement de (**141**) avec du trichloroacétonitrile en condition basique, le dérivé iminoester (**142**) génère l'oxazoline (**143**) par réaction avec du chlorure de diéthylaluminium. L'hydrolyse acide de (**143**), puis la protection au Boc_2O de l'amine conduisent au diol (**144**). L'élimination du groupement *O*-méthoxyméthyle (MOM) fournit le triol (**44**), puis la tosylation de l'alcool primaire et le traitement par du K_2CO_3 permettent la formation du cycle tétrahydrofurane (**46**) par substitution nucléophile intramoléculaire. Enfin le clivage du groupement Boc donne la jaspine B avec un rendement global de 14% sur 15 étapes.

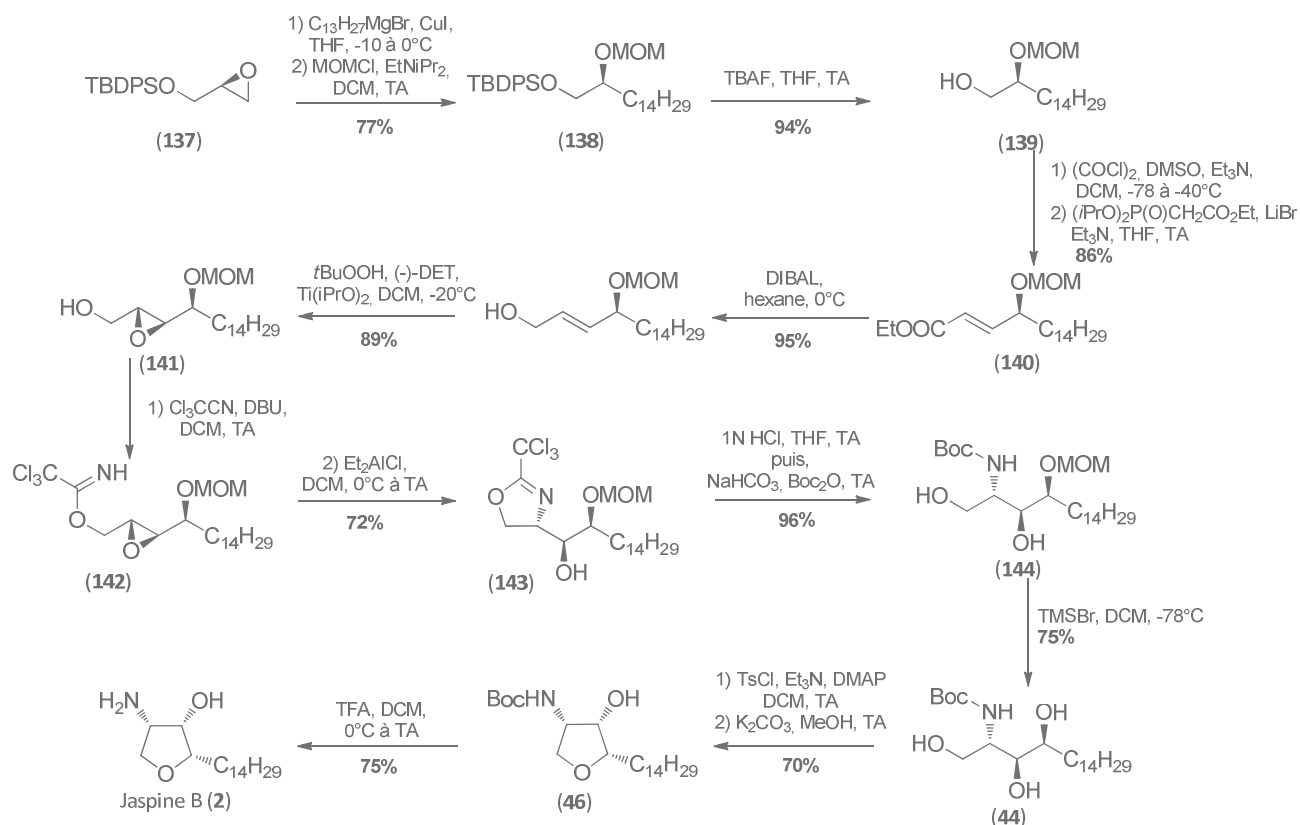


Schéma 21 - Synthèse de la jaspine B (2) à partir du dérivé du (R)-glycidol (137) selon J.A. Marco

2) Synthèses asymétriques de la jaspine B à partir de molécules simples

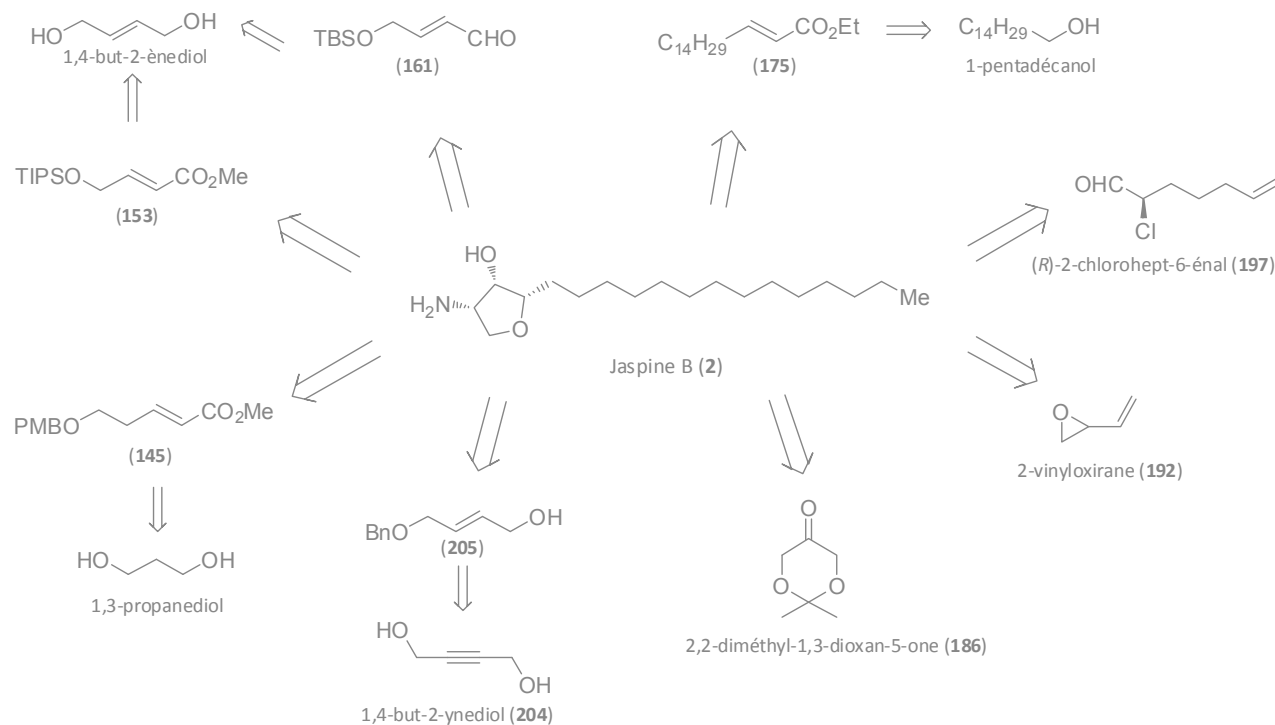
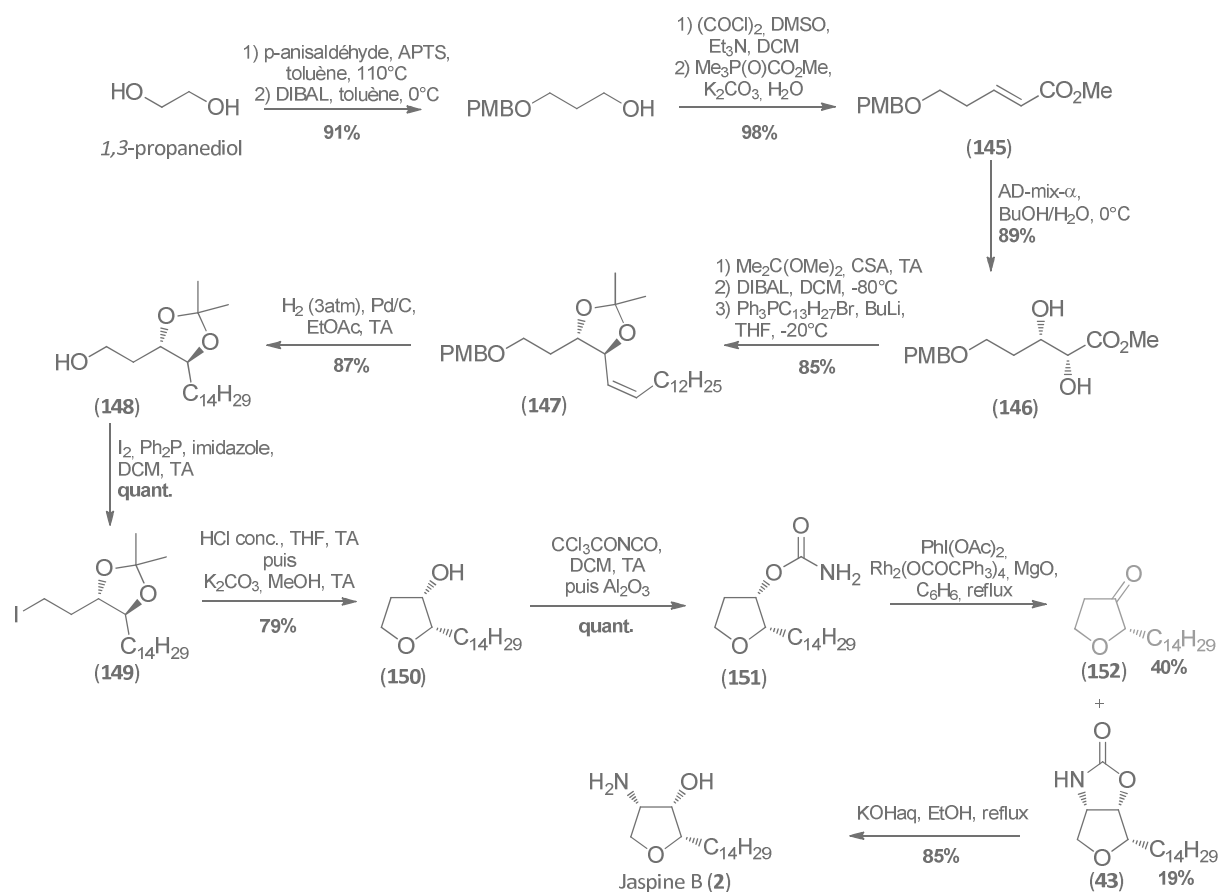


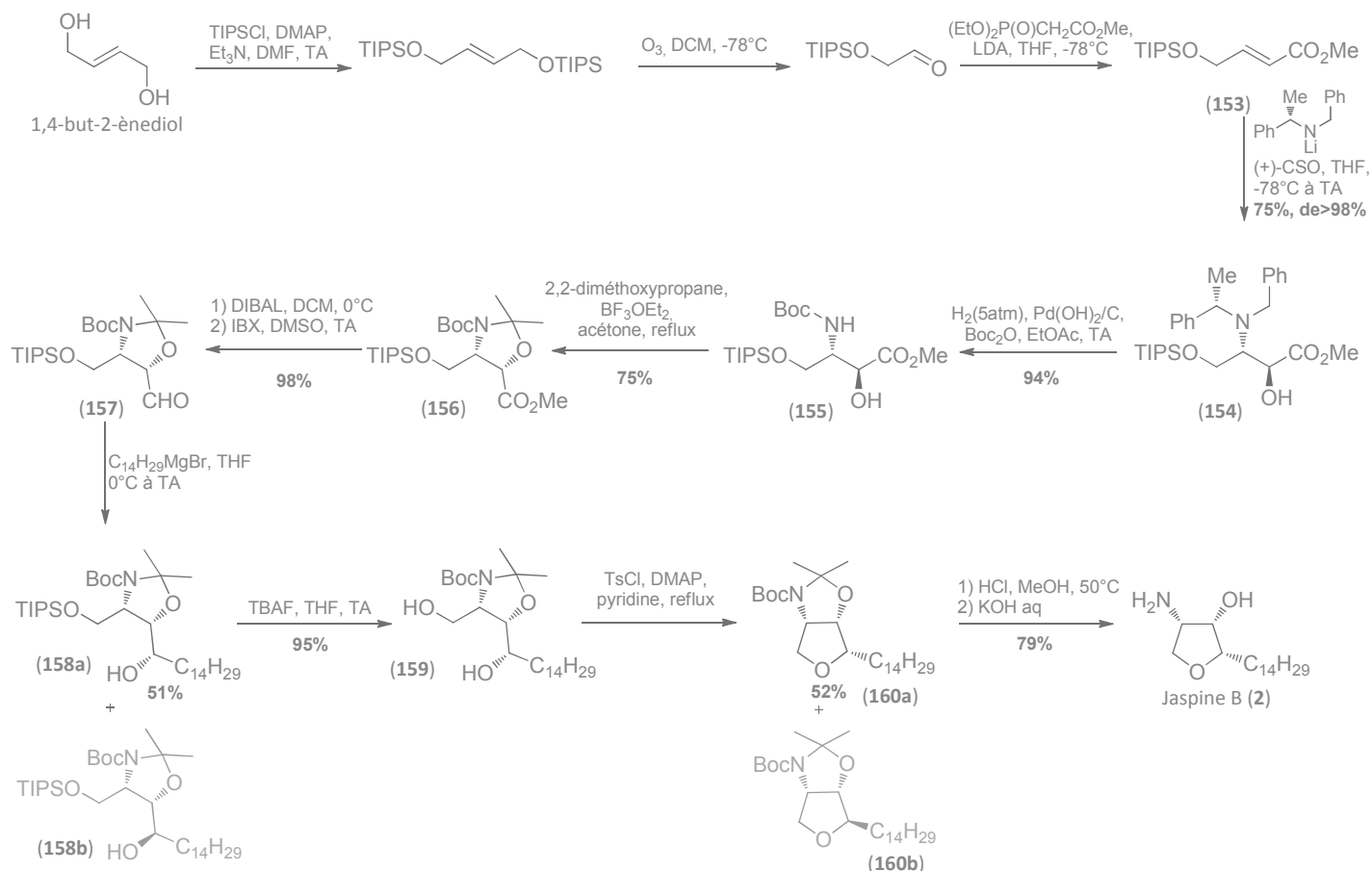
Schéma 22 - Voies de synthèse asymétrique de la jaspine B

L'une des premières voies d'accès à la jaspine B par synthèse asymétrique a été décrite par T. Yakura en 10 étapes à partir (2*E*)-5-*p*-méthoxybenzyloxy-2-pentanoate (**145**).⁵² Cet ester α,β -insaturé est obtenu en 4 étapes à partir du 1,3-propanediol.⁵³ La dihydroxylation asymétrique de (**145**) mène au diol (**146**) avec 98% d'excès énantiomérique. La protection du diol (**146**) par un acétonide, la réduction de l'ester au DIBAL, puis l'oléfination de Wittig de l'aldéhyde obtenu, conduisent au composé (**147**). L'hydrogénation de (**147**) permet la déprotection du PMB et la réduction de la double liaison. Le traitement de l'alcool (**148**) par la triphénylphosphine et du diiode en présence d'imidazole donne l'iodure (**149**). Puis, la déprotection de l'acétonide en catalyse acide, suivie du traitement par K_2CO_3 permettent la formation du cycle tétrahydrofurane (**150**). Le carbamate (**151**) est obtenu par le traitement de (**150**) avec l'isocyanate trichloroacétyle puis avec l'alumine. Une C-H amination catalysée au rhodium (II) fournit le carbamate (**43**) et la furanone indésirée (**152**). L'hydrolyse de (**43**) donne accès à la jaspine B avec un rendement global de 8%.

Schéma 23 - Synthèse de la jaspine B (2) à partir de l'ester α,β -insaturé (**145**) selon T. Yakura

Peu de temps après, S.G. Davies rapporte la synthèse de la jaspine B en 9 étapes à partir de l'ester γ -tri-*iso*-propylsilyloxy- α,β -insaturé (**153**),⁵⁴ dérivant du 1,4-but-2-ènediol.⁵⁵ Le traitement de (**153**) par le sel de lithium (*S*)-*N*-benzyl-*N*- α -méthylbenzylamine et la camphorsulfonyloxaziridine (CSO) donne l'ester *anti*- α -hydroxy- β -amino- γ -silyloxy (**154**) avec un excès diastéréoisomérique supérieur à 98%. L'hydrogénolyse de (**154**) en présence de Boc_2O conduit à (**155**). L'aminoalcool (**155**) est converti en

N,O-acétal (**156**). L'aldéhyde (**157**) est obtenu après réduction puis oxydation successive de (**156**). L'ajout d'un l'organomagnésien sur (**157**) conduit à un mélange d'alcool (**158a**) et (**158b**) séparable par chromatographie. La désilylation de (**158a**) donne le diol (**159**). La tosylation de l'alcool primaire de (**159**) entraîne la formation de deux diastéréoisomères séparables par chromatographie via une cyclisation intramoléculaire spontanée. La déprotection de l'acétal (**160a**) donne accès à la jaspine B avec un rendement global de 10%.

Schéma 24 - Synthèse de la jaspine B (2) à partir de l'ester α,β -insaturé (153) selon S.G. Davies

Une nouvelle synthèse de la jaspine B à partir d'un dérivé du 1,4-but-2-ènediol est décrite en 2010 par S. Kuwahara.⁵⁶ L'aldéhyde α,β -insaturée (**161**) de départ est obtenue en 2 étapes selon le protocole décrit par J.A. Marshall.⁵⁷ L'époxidation asymétrique de Córdova de (**161**) conduit à l'époxyaldéhyde (**162**). (**162**) est ensuite engagé dans une oléfinatation d'Horner-Emmons (*Z*) sélective fournissant le composé (**163**). Le traitement de (**163**) par le TFA entraîne l'hydrolyse de l'ester puis l'ouverture de l'époxide pour former l'hydroxylactone (**164**). La protection de (**164**), puis la désilylation de (**165**) conduisent à l'alcool (**166**). La réaction d'oxy-Michael intramoléculaire sur (**166**) permet la formation du cycle tétrahydrofurane. La réduction de la lactone (**167**) au DIBAL mène au lactol (**168**). Ce dernier est alors engagé dans une réaction de Wittig, puis (**169**) est hydrogéné pour donner le composé (**170**). Après silylation de (**170**), le composé (**171**) résultant est traité par le DDQ, puis oxydé par le périodine de Dess-Martin (DMP) fournissant la cétone (**172**). L'amination réductrice de la cétone (**172**) permet d'obtenir le composé (**173**) qui après désilylation conduit à la jaspine B avec un rendement global de 9% sur 14 étapes.

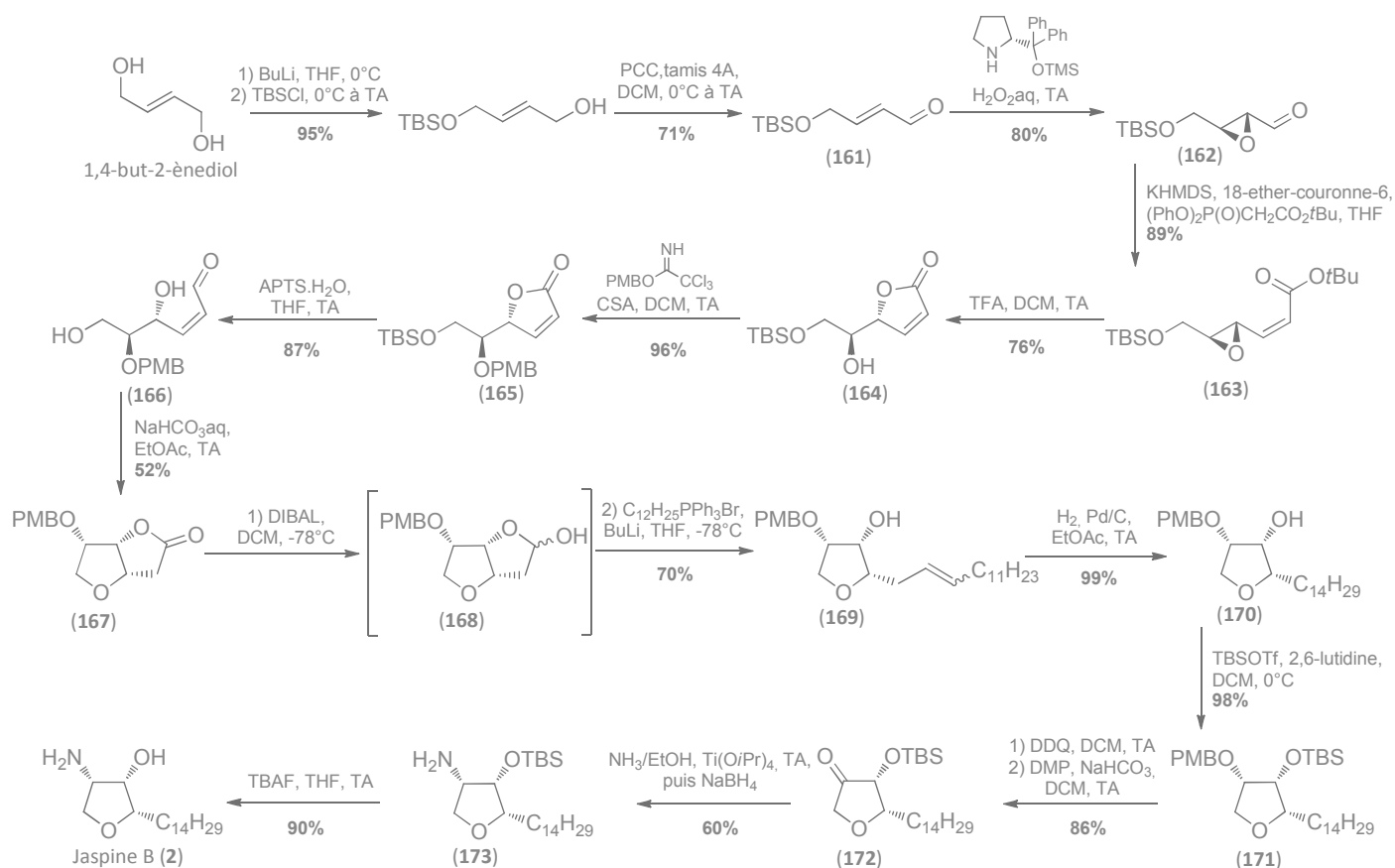


Schéma 25 - Synthèse de la jaspine B (2) à partir de l'aldéhyde α,β-insaturé (161) selon S. Kuwahara

En 2008, K.V. Srinivasan rapporte une synthèse de la jaspine B en 19 étapes à partir du 1-pentadécanol (**174**).⁵⁸ Le 1-pentadécanol est oxydé, puis l'aldéhyde résultant est engagé dans une oléfination de Wittig pour donner l'ester α,β-insaturé (**175**). L'hydroxylation asymétrique de (**175**) conduit au diol (**176**). Après protection du diol par des groupements MOM, l'ester (**177**) est réduit au DIBAL, puis oxydé pour fournir l'aldéhyde (**178**). La vinylation stéréosélective de (**178**) conduit à l'alcool vinylique (**179**) qui après traitement au bromure de benzyle donne le composé (**180**). Le clivage oxydant de (**180**) puis la réduction de l'aldéhyde (**181**) résultante au NaBH₄ donnent l'alcool (**182**). L'alcool (**182**) est ensuite protégé par un groupement MOM, puis hydrogéné donnant le composé débenzylé (**183**). L'azoture (**184**) est obtenu après activation de l'alcool (**183**) avec un groupement tosylo puis traitement du tosylate par de l'azoture de sodium. La déprotection des alcools du composé (**184**) puis la tosylation de l'alcool primaire donnent le composé (**185**). Le traitement de (**185**) par du K₂CO₃ permet la formation du cycle tétrahydrofurane, puis la réduction de l'azoture (**39**) fournit la jaspine B avec un rendement global de 26%.

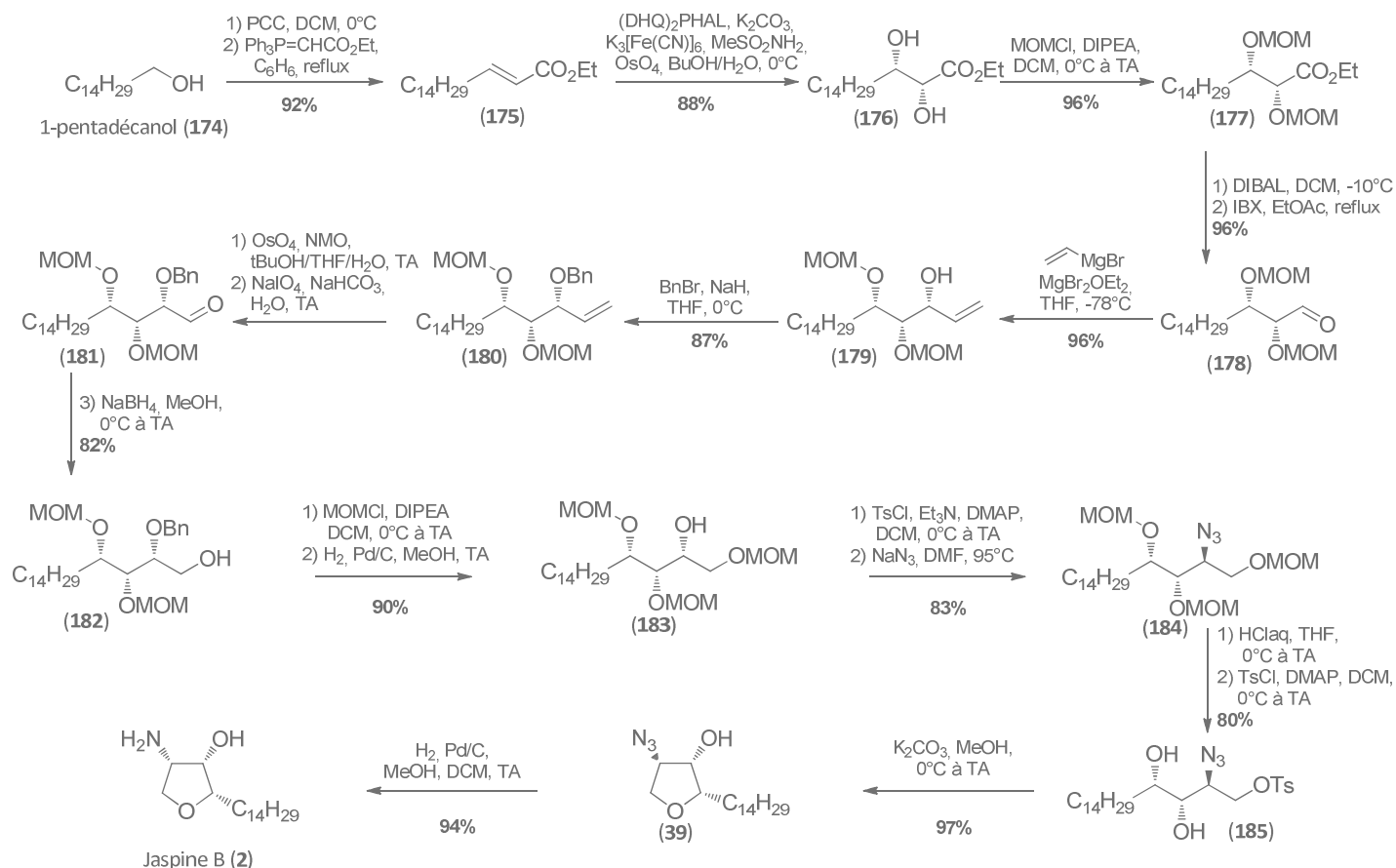


Schéma 26- Synthèse de la jaspine B (2) à partir du pentadécanol (174) selon K.V. Srinivasan

Dans le même temps, D. Enders décrit une synthèse de la jaspine B à partir du dérivé dioxanone (186).⁵⁹ L'aldolisation organocatalysée de (186) et du 1-pentadécanal permet l'insertion énantiosélective de la chaîne alkyle de la jaspine B. La silylation de l'alcool (187), puis la réduction diastéréosélective de (188) fournissent l'alcool (189). La méssylation de (189), puis la substitution du mésylate par l'azoture donnent le composé (190). Après déprotection de l'éther silylé (190) par le fluorure de tétra-*n*-butylammonium (TBAF), l'alcool résultant est activé par une tosylation menant à l'intermédiaire (191). Le traitement de (191) à l'amberlyst-15 entraîne la formation du cycle tétrahydrofurane, puis l'hydrogénation de l'azoture (39) conduit à la jaspine B avec un rendement global de 23% sur 9 étapes.

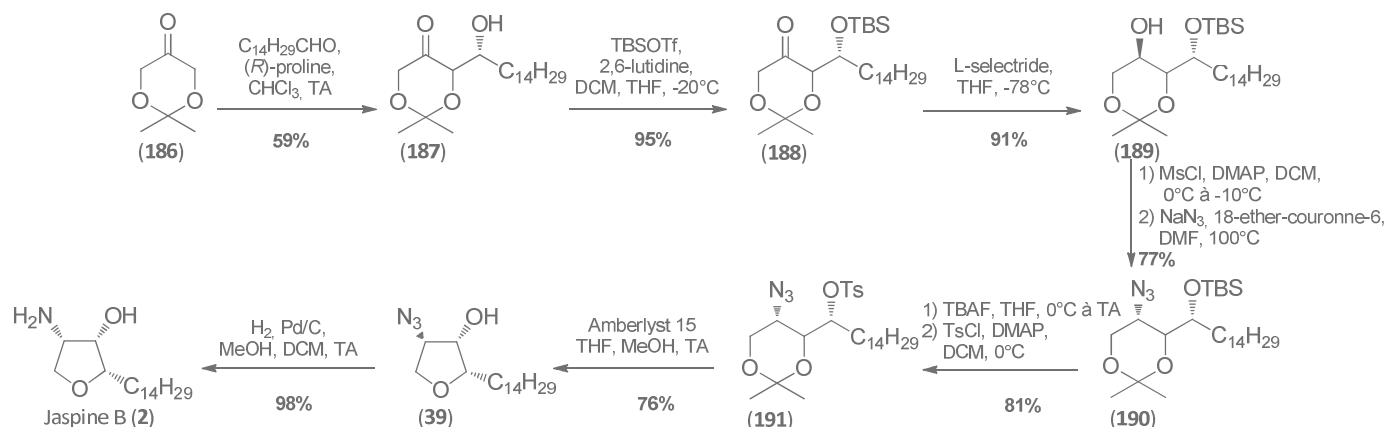
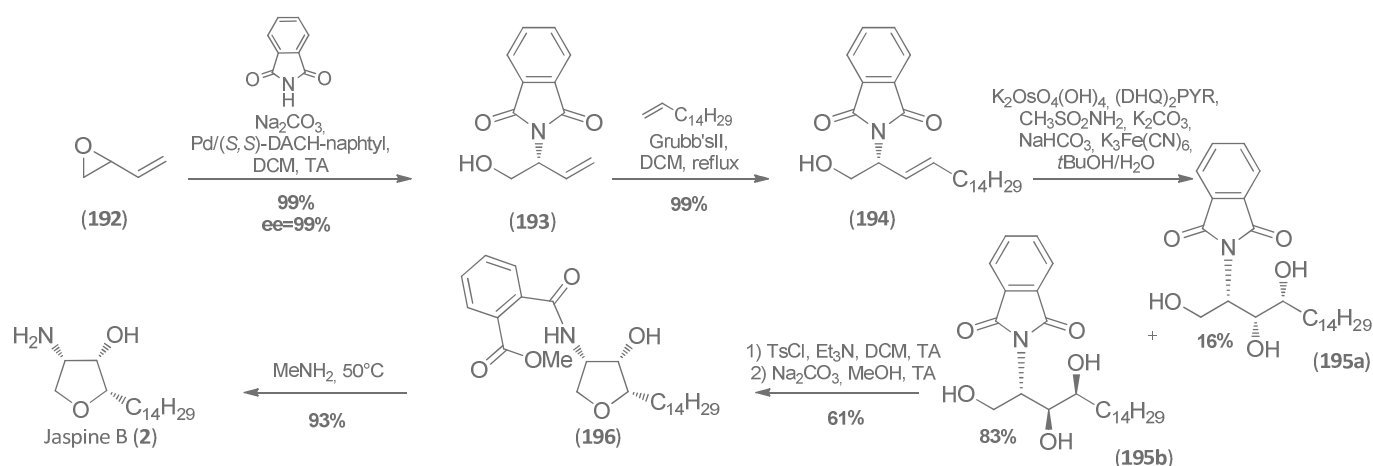
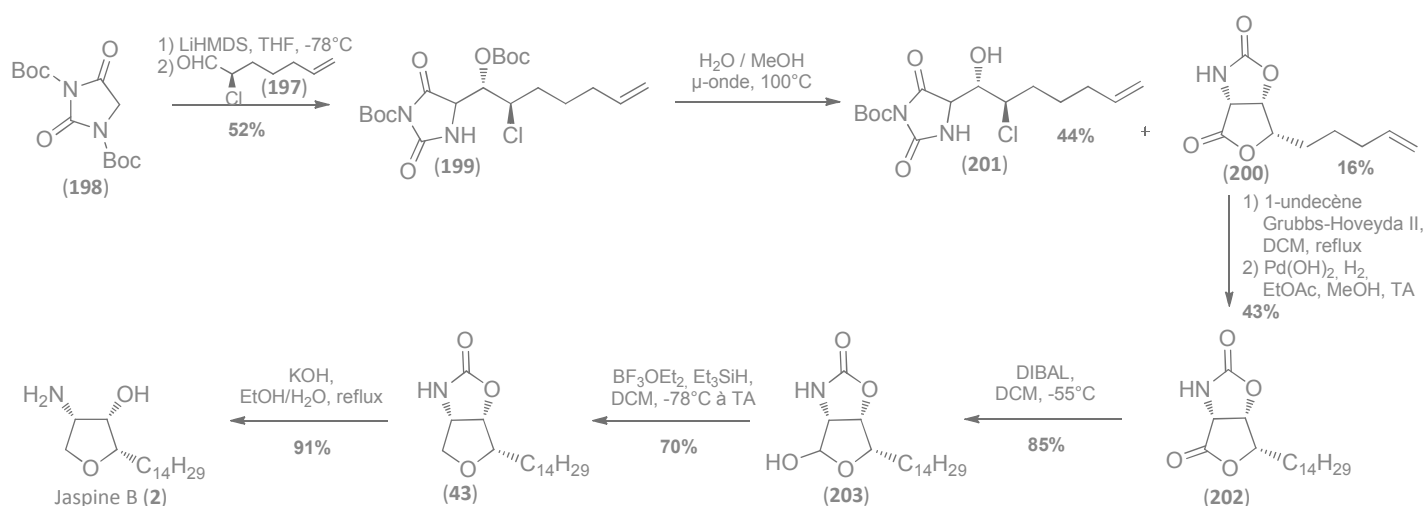


Schéma 27 - Synthèse de la jaspine B (2) à partir du dérivé dioxanone (186) selon D. Enders

Plus récemment, S. Castillón et M.I. Matheu ont publié une nouvelle synthèse de la jaspine B en 6 étapes à partir d'un mélange racémique du 2-vinyloxirane (**192**).⁶⁰ L'addition énantiosélective catalysée au palladium du phthalimide sur l'époxide (**192**) fournit le composé (**193**). La métathèse croisée entre (**193**) et le 1-hexadécène conduit à l'alcène (**194**). La dihydroxylation de (**194**) à l'osmium donne un mélange de diastéréoisomères (**195a**) et (**195b**), séparables par chromatographie. La mono-tosylation de (**195b**), de type L-*lyxo*-phytosphingosine, puis le traitement par Na₂CO₃ dans le méthanol entraînent une méthanolyse partielle du groupement phthalimide et la formation du cycle tétrahydrofurane. Le traitement du composé cyclique (**196**) par la méthylamine aboutit à la jaspine B avec un rendement global de 46%.

Schéma 28 - Synthèse de la jaspine B (**2**) à partir du 2-vinyloxirane (**192**) selon S. Castillon et M.I. Matheu

En 2013, R. Britton décrit la synthèse de la jaspine B à partir de l' α -chloroaldéhyde (**197**) et de l' α -aminolactame (**198**).⁶¹

Schéma 29 - Synthèse de la jaspine B (**2**) à partir du α -chloroaldéhyde (**197**) selon R. Britton

Le traitement de (**198**) par l'hexaméthylsilazane de lithium (LiHMDS) permet la formation d'un α -aminoénolate, puis l'addition de (**197**) de type Evans-Cornforth^{62, 63} mène à l'aldol (**199**). Le chauffage aux micro-ondes de (**199**) dans un mélange eau/méthanol fournit la γ -lactone (**200**) ainsi que la chlorohydrine (**201**). La métathèse croisée de (**200**) et du 1-undécène, puis l'hydrogénation

conduisent à la lactone (**202**). La lactone (**202**) est ensuite réduite au DIBAL, puis le traitement du mélange de lactol (**203**) avec Et_3SiH et BF_3OEt_2 fournit le composé (**43**). L'hydrolyse basique de (**43**) donne la jaspine B avec un rendement global de 5% sur 8 étapes.

Avant mon arrivée au laboratoire, une autre synthèse asymétrique de la jaspine B et de divers analogues a été développée à partir de la butyne-1,4-diol (**204**).^{64, 65} La monobenzoylation du diol (**204**) puis la réduction de l'alcyne fournissent l'alcool *trans*-allylique (**205**). (**205**) est ensuite engagé dans une époxydation asymétrique de Sharpless, suivie de l'ouverture régio- et stéréosélectivité de l'époxide à la *para*-méthoxybenzylamine pour donner un mélange d'aminodiols (**206a**) et (**206b**). Le mélange (**206**) est traité au chloroformiate de méthyle, puis saponifié entraînant une cyclisation intramoléculaire. Les deux oxazolidinones résultantes (**207a**) et (**207b**) sont alors séparées par chromatographie, puis (**207a**) est oxydée au DMP menant à l'aldéhyde (**208**). L'addition *anti*-sélective de l'organocérium, issu de la réaction entre le bromure de vinylmagnésium et le chlorure de cérium, sur l'aldéhyde (**208**) conduit à l'alcool vinylique (**209**). La méssylation de (**209**) entraîne une cyclisation intramoléculaire spontanée lors de la purification sur gel de silice, donnant accès au composé (**210**). L'insertion de la chaîne aliphatique est réalisée par une réaction de métathèse croisée, puis une hydrogénation résultant au carbamate (**211**). Enfin, le clivage oxydant du PMB, puis l'hydrolyse basique du carbamate (**43**) conduisent à la jaspine B avec un rendement global de 4% sur 13 étapes.

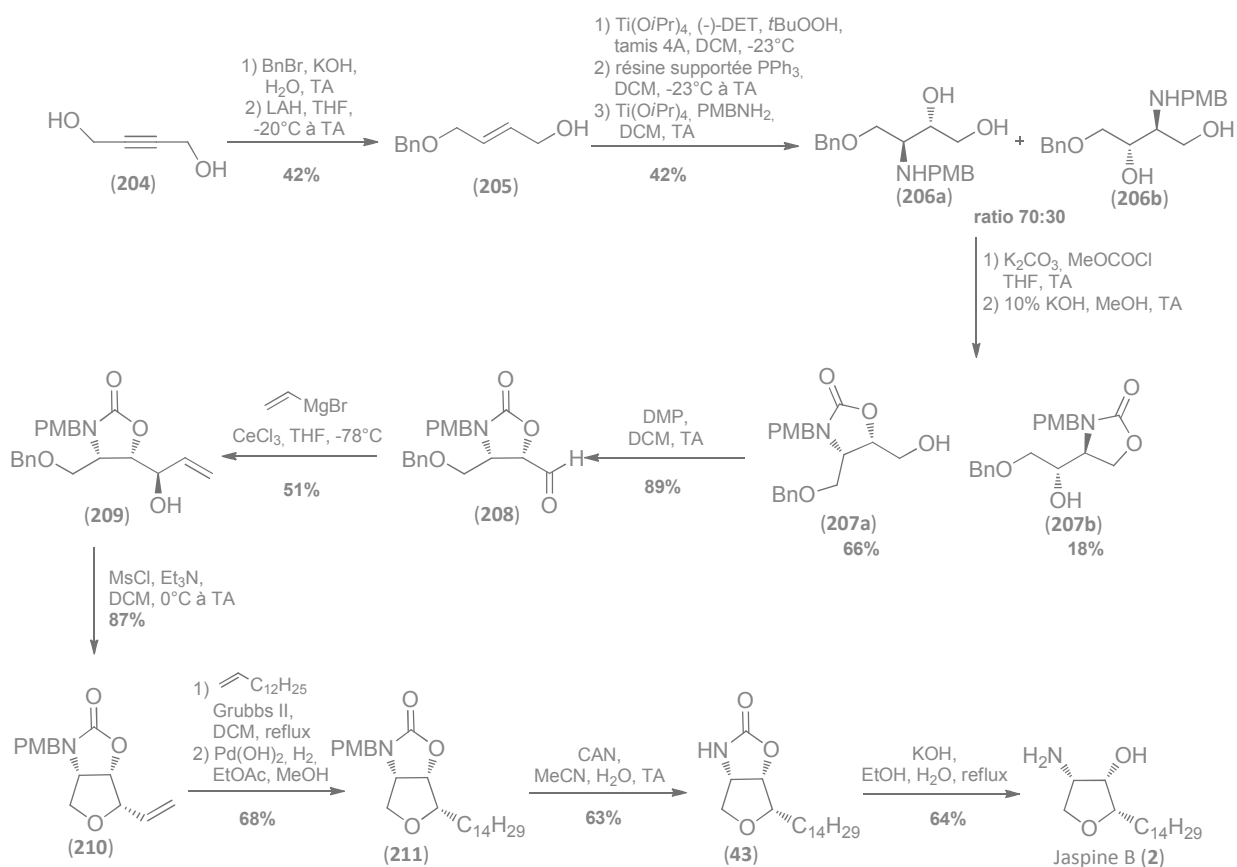


Schéma 30 - Synthèse de la jaspine B (**2**) à partir du la butyne-1,4-diol (**204**) développée au laboratoire

III. Nouvelle voie d'accès à la jaspine B

L'activité cytotoxique de la jaspine B nous a motivé à développer une nouvelle voie d'accès à ce composé. Cette nouvelle voie de synthèse s'appuie sur l'intermédiaire aziridino- γ -lactone pour la formation du cycle *cis*-amino-alcool-tétrahydrofurane par une ouverture régiosélective de l'aziridine et cyclisation intramoléculaire successive. L'insertion de la chaîne aliphatique est réalisée dans un second temps sur l'oxazolidinone lactone par oléfination de Julia, puis hydrogénation diastéréosélective (cf. Schéma 31).

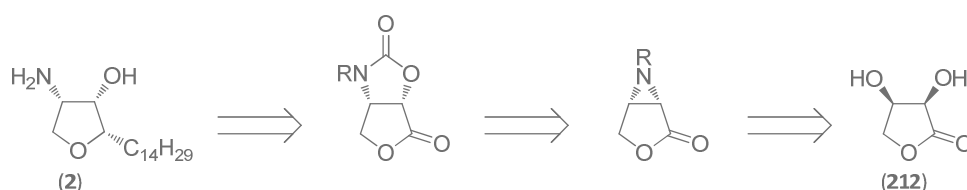


Schéma 31 - Schéma rétrosynthétique de la jaspine B

Ainsi, cette synthèse racémique, en 6 étapes à partir de la D-erythrone lactone (**212**), permet d'obtenir la jaspine B (**2**) et son énantiomère l'*ent*-jaspine (**7**) après séparation chirale par chromatographie en fluide supercritique, avec un rendement global de 7% (cf. Schéma 32).

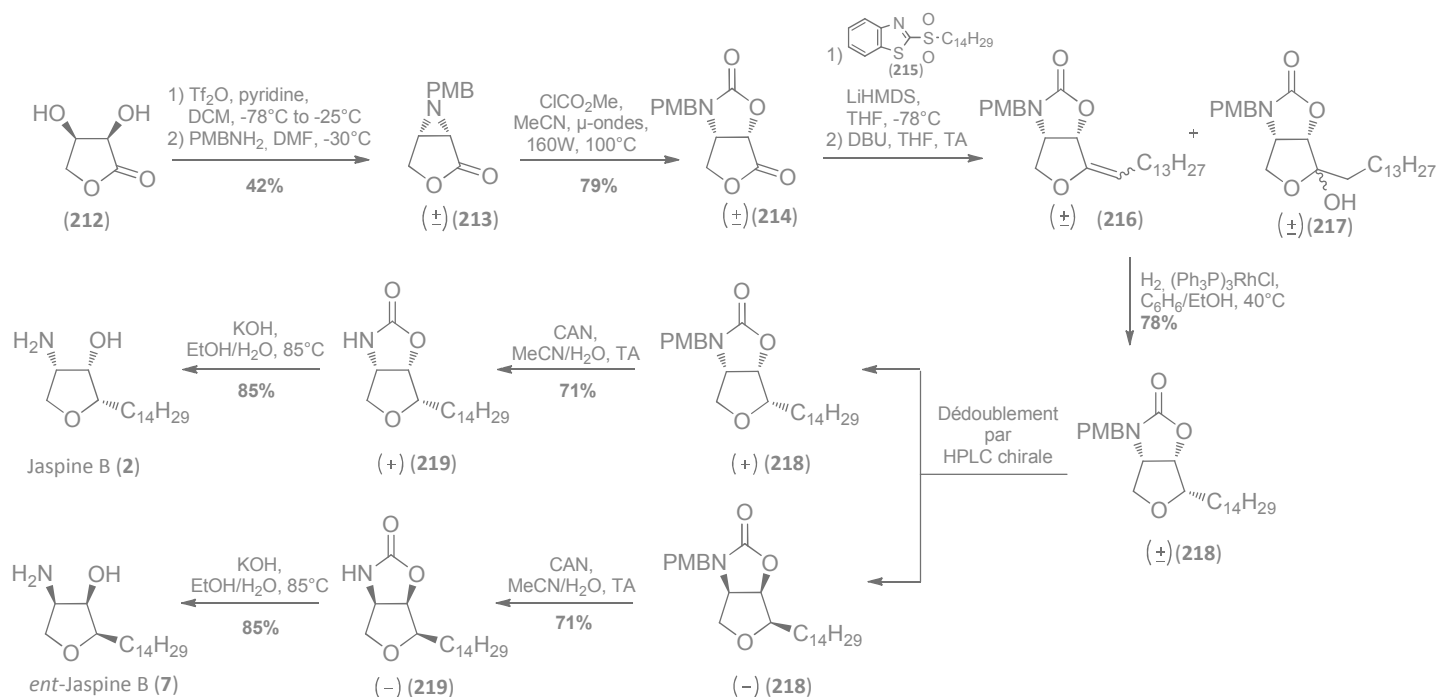


Schéma 32 - Synthèse de la jaspine B

Ces travaux sont détaillés dans l'article suivant.¹⁵



Rapid access to jaspine B and its enantiomer

Cécile Santos^a, Isabelle Fabing^a, Nathalie Saffon^b, Stéphanie Ballereau^{a,*}, Yves Génisson^{a,*}^a LSPCMIB, UMR-5068, CNRS, Université de Toulouse, UPS, Toulouse, France^b Université de Toulouse, UPS, Institut de Chimie de Toulouse, FR2599 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 May 2013

Received in revised form 21 June 2013

Accepted 25 June 2013

Available online 1 July 2013

Keywords:

Jaspine B

Pachastrissamine

Sphingosine

Aziridine

Lactone

ABSTRACT

A rapid access to jaspine B and its enantiomer *ent*-jaspine B from a 2,3-aziridino- γ -lactone is reported. This synthesis relies on a one pot regioselective aziridine ring-opening followed by intramolecular cyclization to install the *cis*-amino–alcohol pattern of jaspine B and on a modified Julia olefination of the lactone followed by a diastereoselective hydrogenation for the introduction of the C14 aliphatic chain. The separation of enantiomers in the course of this synthesis was achieved by supercritical fluid chromatography. The cytotoxicity of both enantiomers was evaluated.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Jaspine B (also named Pachastrissamine) (Fig. 1) is a naturally occurring anhydrophytosphingosine, which was first isolated in 2002 from the Okinawan marine sponge, *Pachastrissa* sp.¹ One year later Debitus et al.² also extracted this natural *D*-ribo-phytosphingosine derivative from the sponge *Jaspis* sp. collected in Vanuatu. This natural jaspine B was reported to exhibit submicromolar cytotoxicity against various cell lines.^{1,2} We found in particular that jaspine B

displays a strong dose- and time-dependent cytotoxicity towards melanoma cells (murine B16 and human SK-Me128).³ However, despite a significant interest in the molecular mechanism of cell death induced by jaspine B,^{3,4} this likely complex and multi-target mode of action has not been characterized fully. Recently, Kim et al. also highlight the potential use of jaspine B as a therapeutic agent against hyperproliferative diseases, such as melanoma.⁵

Due to this remarkable biological activity and its relatively simple structural features, jaspine B has stimulated considerable interest of the synthetic community.^{6,7} To go deeper in the understanding of the structure–activity relationships of this natural compound, many analogues were synthesized⁸ as well as diastereoisomers of jaspine B.^{4a,b,6a,7f–j,8a,9} The enantiomer *ent*-jaspine B was not the deal of such an effort from the synthetic point of view^{4b,7k,9a,10} and study of its biological activity remains limited.^{4b,9a}

In this paper, we wish to report a rapid synthetic access to jaspine B and its enantiomer and the evaluation of their cytotoxic activity.

2. Results and discussion

2.1. Synthetic approach

Recently, we described the synthesis of phytosphingosine and jaspine B analogues containing an aziridine ring.^{8c} These syntheses were based on an aziridino- γ -lactone as a common precursor

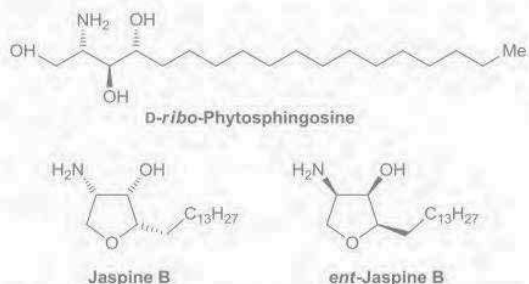
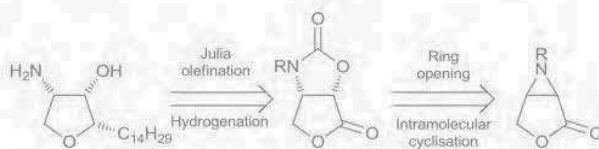


Fig. 1. Structure of *D*-ribo-phytosphingosine, jaspine B and its enantiomer.

* Corresponding authors. Tel.: +33 (0)5 61 55 62 99; fax: +33 (0)5 61 55 60 11; e-mail addresses: ballereau@chimie.ups-tlse.fr (S. Ballereau), genisson@chimie.ups-tlse.fr (Y. Génisson).

(Scheme 1). We envisioned that this versatile intermediate was ideally suited to assemble the jaspine B all-*cis* tetrahydrofuran framework according to the following retrosynthetic scheme (Scheme 1).



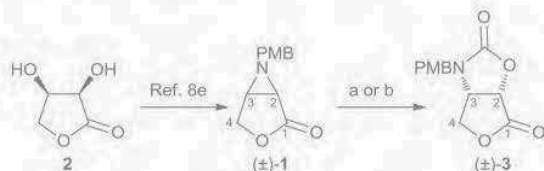
Scheme 1. Retrosynthetic approach to jaspine B.

The two main features of this approach are: (1) the construction of the *cis*-amino–alcohol pattern through a one pot regioselective aziridine ring-opening followed by intramolecular cyclization and (2) the introduction of the C14 aliphatic chain through a modified Julia olefination of the lactone followed by a diastereoselective hydrogenation.

2.2. Synthesis

2.2.1. Racemic route. Aziridino- γ -lactones are very useful intermediates¹¹ that have been used in the preparation of several amino-acids derivatives.¹²

The 2,3-aziridino- γ -lactones bearing an alkyl group on the nitrogen (Scheme 1, R=alkyl) can be regarded as non-activated aziridine-2-carboxylates. The reactivity of non-activated 2-substituted aziridines towards ring opening reaction has recently been reviewed.¹³ Lee, Ha and coll. showed that the reaction of aziridines bearing an electron withdrawing group at C-2 with methyl chloroformate give oxazolidin-2-ones in a one pot process.¹⁴ We applied this pathway to 2,3-aziridino- γ -lactone **1** (Scheme 2) so as to introduce the *cis*-amino–alcohol moiety present on the tetrahydrofuran ring of the jaspine B.

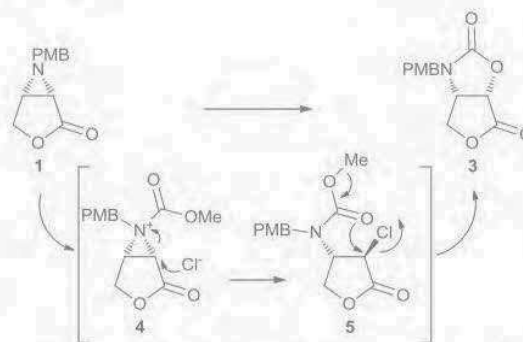


Scheme 2. Synthesis of lactone oxazolidinone **3**. Reagents and conditions: (a) ClCO_2CH_3 , CH_3CN , reflux, 12 h, 74%; or (b) ClCO_2CH_3 , CH_3CN , sealed tube, MW, 160 W, 100 °C, 2 h, 79%.

The racemic 2,3-aziridino- γ -lactone **1** was obtained in two steps from *D*-erythrone (2).^{8c} Under the conditions described by Lee, Ha and coll.¹⁴ the aziridine ring was converted to the oxazolidin-2-one **3**.

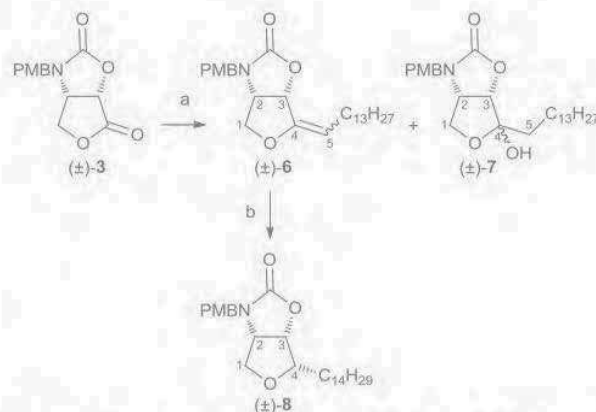
According to the mechanism reported,¹⁴ this transformation, initiated by a *N*-methoxycarbonylation, provides an activated aziridinium **4** that undergoes a regioselective C2–N bond cleavage by the nucleophilic chloride ion. The intramolecular cyclization of the resulting intermediate chlorocarbamate **5** gives the oxazolidin-2-one with a global retention of configuration at C-2 as a result of a double $\text{S}_{\text{N}}2$ inversion process (Scheme 3).

We were satisfied to observe that, despite the presence of the sensitive lactone,^{12a} the yield was only slightly lower than those described by Lee, Ha and coll. In order to further improve the efficiency of this transformation, the reaction time was reduced by the use of microwave irradiation. Under these conditions, only 2 h were necessary to bring the reaction to completion with a 79% yield.



Scheme 3. Proposed mechanism for the oxazolidin-2-one formation.

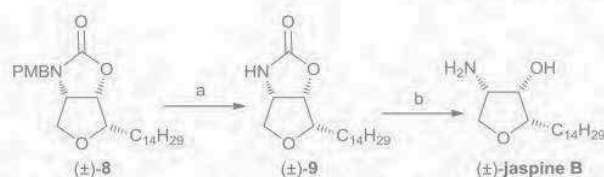
The next step en route to the jaspine B tetrahydrofuran core assembly was the introduction of the C14 alkyl chain. According to our synthetic plan, an olefination of the carbonyl function of the lactone was accomplished by a Julia modified reaction¹⁵ using the methodology recently described by Gueyrard and coll. for the synthesis of *exo*-glycal.¹⁶ The reaction of the lactone **3** and 2-(tetradecylsulfonyl)benzo[d]thiazole¹⁷ (Scheme 4) followed by a treatment with DBU afforded the enol ether **6** as an irrelevant 2:1 mixture of *E/Z* isomers¹⁸ and in a 49% yield. As appeared in the literature during the course of this work,¹⁹ we observed that the enol ether formed was very sensitive to hydration and we could not completely avoid formation of the hemiketal **7** (23% yield after chromatography). Use of boron trifluoride etherate as described by Gueyrard, Goekjian and coll.²⁰ did not improve the conversion. On the other hand, purification on basic alumina instead of silica gel, allowed us to slightly increase the isolated yield in alkenes **6** to 55%.



Scheme 4. Synthesis of racemic protected jaspine B. Reagents and conditions: (a) (1) 2-(tetradecylsulfonyl)benzo[d]thiazole, LiHMDS, THF, –78 °C, 30 min; (2) DBU, THF, rt, 2 h, 55% in **6** and 8% in **7**; (b) H_2 , $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{RhCl}$, $\text{C}_6\text{H}_6/\text{EtOH}$, 2 h, 78%.

Hydrogenation of the olefin in compound **6** employing homogeneous catalyst $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{RhCl}$ ^{7c} furnished the fully protected racemic jaspine B (**8**) as a single diastereoisomer and in a 78% yield. The use of heterogeneous Pd/C catalyst (up to 50 mol %) did not give any hydrogenation product but only hydration product **7**.

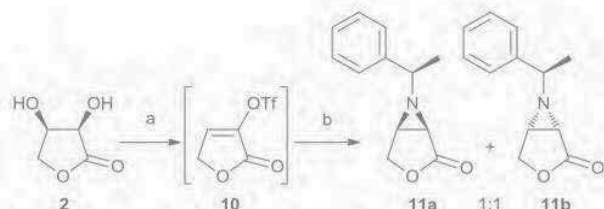
The intermediate **8**, in its enantiomeric pure form, has already been used by our group in the synthesis of jaspine B.^{8d} Following the protocol described, two deprotection steps, that is oxidative elimination of the PMB-group followed by the hydrolysis of the oxazolidinone ring, allowed us to obtain the racemic jaspine B in a 60% yield (Scheme 5).



Scheme 5. Synthesis of racemic jaspine B. Reagents and conditions: (a) CAN, MeCN/H₂O, 2 h, 71%; (b) KOH, EtOH/H₂O, 85 °C, 12 h, 85%.

This six-step synthetic route validated in the racemic form, we were interested in its application to the synthesis of enantiomerically pure jaspine B and its enantiomer.

2.2.2. Chiral auxiliary route. The first option was to start the synthesis with an optically active aziridine. In this aim, we reproduced the two-step synthesis of 2,3-aziridino-γ-lactone starting from D-erythrone (2) via the triflate derivative **10** with the (R)-(+)-α-methylbenzylamine. A mixture of two diastereoisomeric aziridino-γ-lactone **11a** and **11b** was obtained in a 21% yield over the two steps (Scheme 6).



Scheme 6. Synthesis of optically active 2,3-aziridino-γ-lactones. Reagents and conditions: (a) Tf₂O, pyridine, CH₂Cl₂, −78 °C to −30 °C, 3.5 h; (b) (R)-(+)-α-methylbenzylamine, DMF, −30 °C, 12 h, 21% over two steps.

Due to the lower reactivity of α-methylbenzylamine compared to methoxy-substituted benzylamines in the tandem Michael-type addition/cyclization leading to the aziridine,^{12a} the reaction time at −30 °C necessary for the completion was much longer and the competitive opening of the lactone ring by the amine may explain the somewhat moderate yield.^{12b} This aziridination reaction was also conducted with enantiomerically pure (R)-p-methoxy-α-methylbenzylamine. The use of this chiral auxiliary did not improve the yield of the reaction. The two (R)-p-methoxy-α-methylbenzyl substituted aziridines were isolated and characterized including by X-ray diffraction crystallography (see Supplementary data).

Even after several thorough chromatographies on silica gel only milligramme-scale samples of each diastereoisomer **11a** and **11b** could be isolated. Nevertheless, X-ray crystallography analysis of compound **11a** allowed its unambiguous structural assignment (Fig. 2).

The mixture of diastereoisomers **11** was treated with methyl chloroformate in acetonitrile under MW irradiation to give the two diastereoisomeric oxazolidinones **12a** and **12b** that were separated by chromatography on silica gel (Scheme 7). The yield (25% for each diastereoisomer) was lower than in the p-methoxybenzyl racemic series.

This moderate yield with α-methylbenzyl substituted aziridine may deserve comments. Indeed, Lee, Ha and coll. described transformation of N-[(R)-(+)-α-methylbenzyl]aziridines-2-carboxylates to 5-functionalized oxazolidin-2-ones in almost quantitative yield.¹⁴ Thus, the presence of the α-methylbenzyl group instead of the p-methoxybenzyl does not by itself explain the lowering of the yield. Nevertheless, this trend could be expected since it has already been shown that N-benzyl-2,3-aziridino-

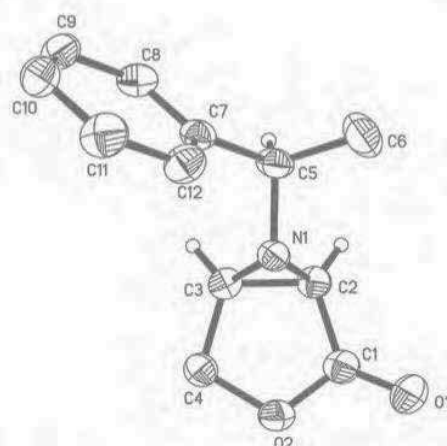
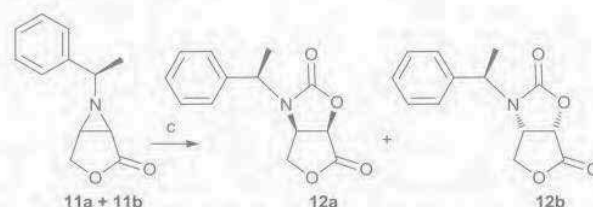


Fig. 2. Molecular view of the aziridino-γ-lactone **11a** in the solid state (thermal ellipsoids at 50% probability); hydrogen atoms are omitted for clarity excepted on asymmetric carbons.



Scheme 7. Synthesis of optically active lactone oxazolidinones. Reagents and conditions: (a) ClCO₂CH₃, CH₃CN, sealed tube, MW, 160 W, 100 °C, 2.5 h, 50%.

γ-lactones have a much lower reactivity towards nucleophilic aziridine ring opening than the N-benzyl-2-acyl-aziridines.^{12a} This lack of reactivity was thus not only attributed to the poor electron-withdrawing character of the benzyl group but also to the competitive electrophilic behaviour of the lactone ring.

The two diastereoisomers **12a** and **12b** were crystallized and X-ray analysis allowed their structural assignment (Figs. 3 and 4).

The yield obtained in the two first steps of this synthesis using (R)-(+)-α-methylbenzylamine as chiral auxiliary, much lower than in the p-methoxybenzyl racemic series, associated with fastidious chromatographies required for the separation of the diastereoisomers led us to consider another option for the synthesis of enantiomerically pure jaspine B and its enantiomer. We developed a separation method of both enantiomers of the racemic protected jaspine B.

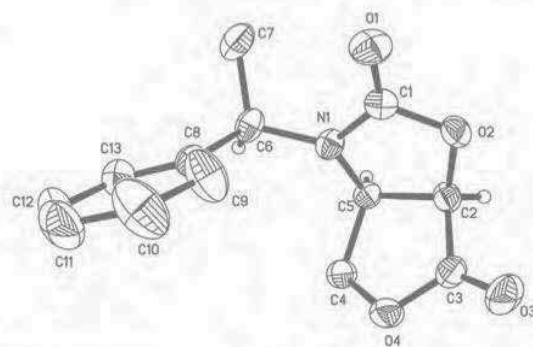


Fig. 3. Molecular view of compound **12a** in the solid state (thermal ellipsoids at 50% probability); hydrogen are omitted for clarity excepted on asymmetric carbons.

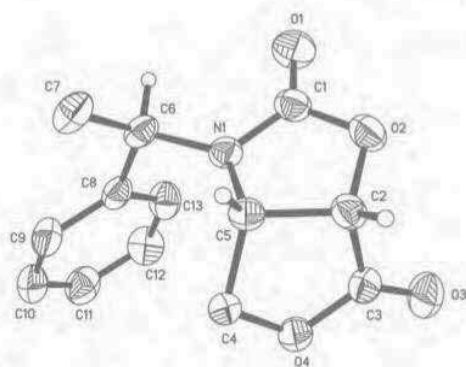


Fig. 4. Molecular view of compound **12b** in the solid state (thermal ellipsoids at 50% probability); hydrogen atoms are omitted for clarity excepted on asymmetric carbons.

2.2.3. Enantiomers separation. The resolution of enantiomers by supercritical fluid chromatography (SFC) is a flourishing technology. The environmental and practical benefits of SFC (e.g., less solvent used, higher resolution, shorter separation times,...) are already well-known.²¹ It is even sometimes considered that it is more 'time efficient' to synthesize racemic mixtures and then chromatographically separate the enantiomers than to develop asymmetric syntheses of the drug candidates of interest.²² An overview of SFC applications for chiral separations covering the literature from 2000 has recently been published.²³

In our case, the best resolution was achieved by semi-preparative SFC on a Chiralpak IC column (5 μ m silica particles immobilized with cellulose tris-(3,5-dichlorophenylcarbamate)) with 25% of a $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ mixture (80:20, v/v) as an additive in a CO_2 mobile phase (Fig. 5). This separation could be run on more than 100 mg and both enantiomers were obtained in high efficiency and purity (80% global yield).

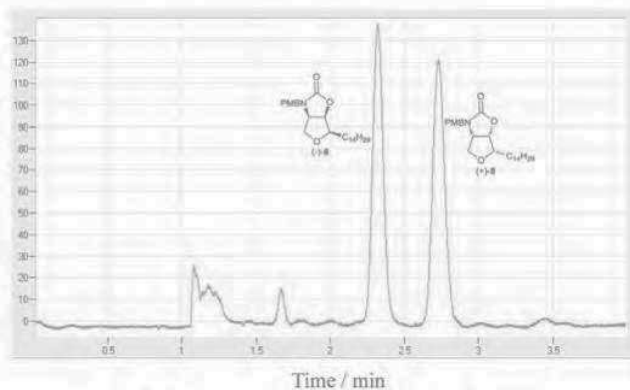


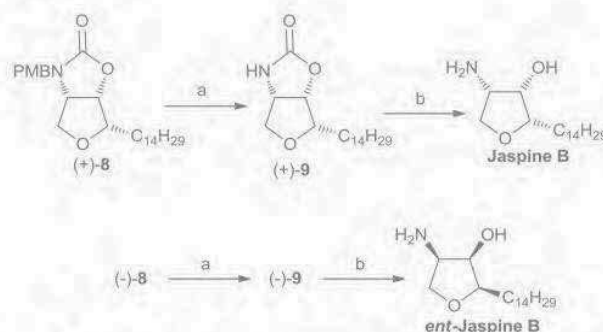
Fig. 5. Separation of the enantiomers of (±)-**8** by SFC.

Each enantiomer of protected jaspine B ((+)-**8** and (–)-**8**) was submitted to the same two steps deprotection protocol leading to jaspine B and its enantiomer *ent*-jaspine B in 60% yield (Scheme 8).

Enantiomerically pure jaspine B and its enantiomer were thus synthesized in six steps from commercially available D-erythronolactone in 7% overall yield.

2.3. Biological evaluation

Despite the synthetic efforts dedicated to the synthesis of various diastereoisomers of jaspine B, only two groups reported



Scheme 8. Synthesis of jaspine B and *ent*-jaspine B. Reagents and conditions: (a) CAN, MeCN/ H_2O , 2 h; (b) KOH, EtOH/ H_2O , 85 $^\circ\text{C}$, 12 h, 60% over two steps.

biological evaluation of *ent*-jaspine B: Rao and coll. evaluated its cytotoxicity^{9a} while Fujii, Oishi and coll. assessed its inhibitory potency against sphingosine kinases.^{4b} In these two studies, the results obtained with *ent*-jaspine B proved to be very close to that of the natural enantiomer. On the other hand, Casas and Delgado and coll.^{4a} showed that inversion of C-2 and/or C-3 stereocenters provides significantly less toxic compounds.

In order to go further in the understanding of the influence of the absolute configuration on the cytotoxic activity, the cytotoxicity of jaspine B and *ent*-jaspine B was examined on GM637 (normal fibroblast), HTC116 (human colon carcinoma) and U2OS (human osteosarcoma) cells. The IC_{50} of the compounds are reported in Table 1.

Table 1
Cytotoxicity of jaspine B and *ent*-jaspine B

Compound	IC_{50} (μM)		
	GM637	HTC116	U2OS
jaspine B	0.4	0.7	0.17
<i>ent</i> -jaspine B	6	5	4

In all cell lines, the natural compound, with IC_{50} values in sub-micromolar range, proved to be significantly more cytotoxic than its enantiomer. These results indicate that the absolute configuration of the tetrahydrofuran jaspine B is indeed determinant for the biological activity of this natural compound. Nevertheless, it is noteworthy that the cytotoxicities obtained for the unnatural compound are in the micromolar range. These values thus justify the study of the enantiomer of jaspine B itself for further target identification and structural optimization.

3. Conclusions

In summary, we have developed a rapid synthesis of jaspine B and *ent*-jaspine B involving six synthetic steps from commercially available D-erythronic γ -lactone and a chiral separation by supercritical fluid chromatography (SFC). This synthesis illustrated well the versatility of 2,3-aziridino- γ -lactone intermediates, alternatively taking advantage of its different reactivities: first, that of the aziridine ring to install the *cis*-amino-alcohol moiety through a one pot regioselective ring-opening followed by intramolecular cyclization and, second, the reactivity of the lactone to introduce the aliphatic chain by a Julia modified olefination followed by a diastereoselective hydrogenation. Thanks to an efficient enantiomeric resolution by a chiral SFC, this route was easily amenable to the preparation of natural jaspine B and its enantiomer. Biological evaluation of the synthesized compounds confirmed the influence of the absolute configuration of the natural product on its

cytotoxicity. Yet the cytotoxicity retained by the *ent*-jaspine B (in the micromolar range) justifies the interest of a synthetic access to both enantiomers.

4. Experimental part

4.1. General methods

The following solvents and reagents were dried prior to use: CH_2Cl_2 , MeOH (from calcium hydride), Et_2O , petroleum ether, THF (freshly distilled from sodium/benzophenone). Analytical thin layer chromatography (TLC) was performed using Merck silica gel 60F₂₅₄ precoated plates. Chromatograms were observed under UV light and/or were visualized by heating plates that were dipped in 10% phosphomolybdic acid in ethanol. Column chromatographies were carried out with SDS 35–70 μm flash silica gel. NMR spectroscopic data were obtained with Bruker Advance 300. Chemical shifts are quoted in parts per million (ppm) relative to residual solvent peak. J values are given in hertz. Assignments of chemical shifts are described according to the numbering drawn on Scheme 2 for lactones and on Scheme 4 for all other compounds. Mass spectrometry (MS) data were obtained on a ThermoQuest TSQ 7000 spectrometer, high-resolution mass spectra (HRMS) were performed on a ThermoFinnigan MAT 95 XL. Optical rotations were measured on a Jasco P-2000 polarimeter. $[\alpha]_D$ values are given in $\text{deg dm}^{-1} \text{cm}^3 \text{g}^{-1}$.

For crystallographic analysis, the selected crystals were mounted on a glass fibre using perfluoropolyether oil and cooled rapidly in a stream of cold N_2 . Crystallographic data of the structures for compounds **11a**, **12a** and **12b** were collected on a Bruker-AXS Quazar APEX II diffractometer using a 30 W air-cooled microfocus source (ImS) with focussing multilayer optics at a temperature of 193(2) K, with Mo K α radiation (wavelength=0.71073 Å) by using phi- and omega-scans. The data were integrated with SAINT, and an empirical absorption correction with SADABS was applied.²⁴ The structures were solved by direct methods, using SHELXS-97,²⁵ and refined using the least-squares method on F^2 .²⁵ All non-H atoms were treated anisotropically. Crystallographic data (excluding structure factors) have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre as supplementary publication no. CCDC-935731 (**11a**), CCDC-935732 (**12a**) and CCDC-935733 (**12b**). These data can be obtained free of charge via www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html (or from the CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: (+44) 1223 336 033; or deposit@ccdc.cam.ac.uk).

4.2. Synthesis

4.2.1. (3aS*,6aS*)-3-(4-Methoxybenzyl)dihydrofuro[3,4-d]oxazole-2,6(3H,6aH)-dione (3). Method A: To a solution of **1** (285 mg, 1.30 mmol) in CH_3CN (5 mL) was added methyl chloroformate (151 μL , 1.95 mmol) and the mixture was refluxed for 12 h. After cooling to rt, the mixture concentrated to dryness. The resulting residue was purified by flash chromatography on silica gel ($\text{EtOAc}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 1:9) to give the oxazolidinone **3** (253 mg, 74%) as a white amorphous solid. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.25–7.15 (m, 2H, H_{ar}); 7.00–6.90 (m, 2H, H_{ar}); 4.95 (d, 1H, 2-H, $J_{2-3}=7.9$); 4.67 (d, 1H, CH_2N , $J=15.0$); 4.35 (ddd, 1H, 3-H, $J_{3-2}=7.9$, $J_{3-4a}=4.1$, $J_{3-4b}=1.5$); 4.30 (AB of an ABX, 2H, 4a-H and 4b-H, $J_{4a-4b}=10.8$, $J_{4a-3}=4.1$, $J_{4b-3}=1.5$); 4.29 (d, 1H, CH_2N , $J=14.9$); 3.81 (s, 3H, OMe). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 170.4 (C-1); 159.9 (C-OMe); 155.9 (C=O); 129.8 (C_{ar}); 126.0 (C_{qar}); 114.7 (C_{ar}); 69.8 (C-2); 68.5 (C-4); 55.4 (C-3); 55.2 (OMe); 46.8 (CH_2N). HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 264.0872; found: 264.0863.

Method B: To a solution of **1** (472 mg, 2.16 mmol) in CH_3CN (7 mL) in a 10 mL glass pressure vial equipped with a stir bar was added methyl chloroformate (250 μL , 3.23 mmol). The pressure vial

was closed using a PTFE-silicon septum (vial and septum available from CEM Corporation). Then the reaction mixture was submitted in a sealed tube to microwave irradiation (CEM Discover™ reactor, 160 W, 100 °C) for 2 h. After cooling, the reaction mixture was concentrated to dryness. The resulting residue was purified by flash chromatography on silica gel ($\text{EtOAc}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 1:9) to give the oxazolidinone **3** (451 mg, 79%) as a white amorphous solid.

4.2.2. (3aS*,6aS*,E)-3-(4-Methoxybenzyl)-6-tetradecylidenetetrahydrofuro[3,4-d]oxazol-2(3H)-one (E-6) and (3aS*,6aS*,Z)-3-(4-methoxybenzyl)-6-tetradecylidenetetrahydrofuro[3,4-d]oxazol-2(3H)-one (Z-6). To a solution of lactone **3** (75 mg, 0.29 mmol) and 2-(tetradecylsulfonyl)benzo[d]thiazole (135 mg, 0.34 mmol) in anhydrous THF (2 mL) under nitrogen at –78 °C was added dropwise a solution of LiHMDS (1.0 M in THF, 570 μL , 0.57 mmol) over 10 min. The reaction mixture was stirred at that temperature for 30 min and quenched by addition of water. After hydrolysis, the mixture was extracted with EtOAc (3 \times 10 mL). The combined organic extracts were dried over magnesium sulfate and concentrated to dryness. The residue was dissolved in anhydrous THF (6 mL) and DBU (98 μL , 0.57 mmol) was added. After 2 h stirring, the reaction mixture was concentrated to dryness and the resulting residue was purified by flash chromatography on basic alumina ($\text{EtOAc}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{petroleum ether}$ 6:24:70) to give the compound **6** (70 mg, 55%) as a 2:1 mixture of *E* and *Z* isomers. An aliquot of this mixture was purified by preparative TLC ($\text{EtOAc}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{petroleum ether}$ 4:1:5) to characterize the two isomers.

(*E*)-**6**: ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.25–7.15 (m, 2H, H_{ar}); 6.95–6.85 (m, 2H, H_{ar}); 5.32 (dd, 1H, 3-H, $J_{3-2}=7.9$, $J_{3-5}=1.1$); 5.13 (td, 1H, 5-H, $J_{5-6}=8.1$, $J_{5-3}=1.1$); 4.67 (d, 1H, CH_2N , $J=15.0$); 4.18 (d, 1H, CH_2N , $J=14.9$); 4.16 (ddd, 1H, 2-H, $J_{2-3}=7.9$, $J_{2-1a}=4.4$, $J_{2-1b}=1.4$); 4.01 (dd, 1H, 1b-H, $J_{1b-1a}=10.2$, $J_{1b-2}=1.5$); 3.80 (s, 3H, OMe); 3.71 (dd, 1H, 1a-H, $J_{1b-1a}=10.2$, $J_{1a-2}=4.7$); 2.20–1.90 (m, 2H, 6-H); 1.40–1.15 (m, 22H, 7-H to 17-H), 0.98–0.84 (3H, m, 18-H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 159.6 (C-OMe); 157.2 (C=O); 152.0 (C-4); 129.6 (C_{ar}); 127.1 (C_{qar}); 114.4 (C_{ar}); 106.8 (C-5); 73.2 (C-3); 70.6 (C-1); 58.2 (C-2); 55.3 (OMe); 46.6 (CH_2N); 32.0, 30.2, 29.7 (4C), 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 26.7, 22.7 (C-6 to C-17); 14.2 (C-18). MS (Cl/NH_3): $m/z=461$ ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$). HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 444.3114; found: 444.3125.

(*Z*)-**6**: ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.25–7.15 (m, 2H, H_{ar}); 6.95–6.85 (m, 2H, H_{ar}); 5.12 (d, 1H, 3-H, $J_{3-2}=7.9$); 4.80 (t, 1H, 5-H, $J_{5-6}=7.4$); 4.68 (d, 1H, CH_2N , $J=15.0$); 4.16 (d, 1H, CH_2N , $J=14.9$); 4.14 (ddd, 1H, 2-H, $J_{2-3}=7.7$, $J_{2-1a}=4.9$, $J_{2-1b}=1.6$); 4.08 (dd, 1H, 1b-H, $J_{1b-1a}=10.2$, $J_{1b-2}=1.6$); 3.81 (s, 3H, OMe); 3.80 (dd, 1H, 1a-H, $J_{1b-1a}=10.1$, $J_{1a-2}=4.8$); 2.08 (q, 2H, 6-H, $J=7.2$); 1.40–1.15 (m, 22H, 7-H to 17-H), 0.98–0.84 (3H, m, 18-H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 159.6 (C-OMe); 157.2 (C=O); 151.7 (C-4); 129.7 (C_{ar}); 127.1 (C_{qar}); 114.4 (C_{ar}); 107.0 (C-5); 75.7 (C-3); 71.3 (C-1); 57.8 (C-2); 55.3 (OMe); 46.5 (CH_2N); 32.0, 29.7 (4C), 29.6, 29.5, 29.4 (2C), 29.3, 25.4, 22.7 (C-6 to C-17); 14.2 (C-18). MS (Cl/NH_3): $m/z=461$ ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$). HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 444.3114; found: 444.3136.

Compound **7** (10 mg, 8%) resulting from the hydration of the *exo*-double bond was also isolated.

7: ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.25–7.15 (m, 2H, H_{ar}); 6.90–6.80 (m, 2H, H_{ar}); 4.68 (d, 1H, CH_2N , $J=15.0$); 4.59 (d, 1H, 3-H, $J_{3-2}=7.5$); 4.14 (ddd, 1H, 2-H, $J_{2-3}=7.5$, $J_{2-1a}=3.4$, $J_{2-1b}=1.6$); 4.08 (d, 1H, CH_2N , $J=15.0$); 3.90–3.80 (m, 2H, H-1); 3.79 (s, 3H, OMe); 2.70–2.20 (br s, 1H, OH); 1.96–1.82 (m, 1H, 5a-H); 1.81–1.68 (m, 1H, 5b-H); 1.55–1.40 (m, 2H, 6-H); 1.35–1.15 (m, 22H, 7-H to 17-H); 0.92–0.82 (3H, m, 18-H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 159.6 (C-OMe); 157.0 (C=O); 129.6 (C_{ar}); 127.2 (C_{qar}); 114.4 (C_{ar}); 107.4 (C-4); 80.6 (C-3); 67.6 (C-1); 59.0 (C-2); 55.3 (OMe); 46.3 (CH_2N); 34.9 (C-5); 31.9, 29.8, 29.7 (5C), 29.6 (2C), 29.4, 23.3, 22.7 (C-6 to C-17); 14.2 (C-18). MS (Cl/NH_3): $m/z=479$ ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$). HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 462.3219; found: 462.3227.

4.2.3. (3*aS**,6*S**,6*aS**)-3-(4-Methoxybenzyl)-6-tetradecyltetrahydrofuro[3,4-*d*]oxazol-2(3*H*)-one (**8**). A solution of compound **6** (89 mg, 0.20 mmol) (as a *Z/E* mixture) and (PPh₃)₃RhCl (37 mg, 0.04 mmol) in benzene/EtOH (4 mL, 1:1) was stirred at 40 °C for 14 h under H₂ atmosphere. After concentration to dryness, the residue was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/CH₂Cl₂/petroleum ether 6:24:70 to 10:40:50) to give the compound **8** (70 mg, 78%). All analyses were in agreement with the data reported in the literature.^{8d}

4.2.4. (3*aS**,6*S**,6*aS**)-6-Ethyltetrahydrofuro[3,4-*d*]oxazol-2(3*H*)-one (**9**). To a solution of PMB-protected compound **8** (70 mg, 0.157 mmol) in CH₃CN/H₂O (9:1) (10 mL) was added CAN (517 mg, 0.94 mmol). The mixture was stirred at rt for 12 h, then diluted with water and extracted three times with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with a saturated aqueous NaHCO₃ solution and with brine, dried over MgSO₄ and concentrated to dryness. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/CH₂Cl₂ 4:6) to give the compound **9** (37 mg, 72%). All analyses were in agreement with the data reported in the literature.^{8d}

4.2.5. (2*S**,3*S**,4*S**)-4-Amino-2-tetradecyltetrahydrofuran-3-ol (racemic jaspine B). KOH (34.5 mg, 0.62 mmol) was added to a solution of oxazolidinone (20 mg, 0.062 mmol) in EtOH/H₂O (8:2) (1.5 mL). The mixture was heated at 85 °C for 24 h before being cooled to rt and diluted with EtOAc and brine. The mixture was extracted three times with EtOAc and the combined extracts were concentrated to dryness. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/MeOH/NH₄OH 84.2:15:0.8) to give racemic jaspine B (15.6 mg, 85%). All analyses were in agreement with the data reported in the literature.^{8d}

4.2.6. (1*R*,5*S*)-6-((*R*)-1-Phenylethyl)-3-oxa-6-azabicyclo[3.1.0]hexan-2-one (**11a**) and (1*S*,5*R*)-6-((*R*)-1-phenylethyl)-3-oxa-6-azabicyclo[3.1.0]hexan-2-one (**11b**). To a solution of D-erythronolactone (1.55 g, 13.1 mmol) in dichloromethane (62 mL) held at –78 °C under argon were successively added pyridine (5.31 mL, 65.6 mmol) and a solution of trifluoromethanesulfonic anhydride (10.0 g, 35.4 mmol) in CH₂Cl₂ (16 mL). After 15 min of stirring at –78 °C, the reaction mixture was slowly warmed to –25 °C over a period of 3.5 h. The reaction solution was then poured into cold Et₂O (150 mL). The precipitate was filtered, and the filtrate was evaporated under reduced pressure at 0 °C. The resulting residue was rapidly purified by filtration on silica gel (Et₂O) to afford triflate **10** as a yellow oil, which was directly reacted in the next step. To a solution of compound **10** (1.68 g, 7.23 mmol) in DMF (35 mL) at –30 °C under argon was added dropwise (*R*)-(+)- α -methylbenzylamine (1.40 mL, 10.8 mmol). The reaction mixture was stirred for at –30 °C overnight before being diluted with EtOAc (50 mL) and water (50 mL). The layers were separated, and the aqueous phase was extracted with EtOAc (2×50 mL). The combined organic extracts were dried over magnesium sulfate and concentrated to dryness. The resulting residue was purified by flash chromatography on silica gel (Et₂O/petroleum ether 2:1) to give (1*R*,5*S*)-6-((*R*)-1-phenylethyl)-3-oxa-6-azabicyclo[3.1.0]hexan-2-one (**11a**) (60 mg, 2%), (1*S*,5*R*)-6-((*R*)-1-phenylethyl)-3-oxa-6-azabicyclo[3.1.0]hexan-2-one (**11b**) (60 mg, 2%) and the mixture of the two diastereoisomers (460 mg, 17%).

11a: ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7.4–7.1 (m, 5H, H_{ar}); 4.13 (d, 1H, 4a-H, *J*_{4a-4b}=9.9); 4.04 (dd, 1H, 4b-H, *J*_{4b-4a}=9.9, *J*_{4b-3}=2.9); 2.74 (dd, 1H, 3-H, *J*₃₋₂=4.4, *J*_{3-4b}=3.0); 2.67 (d, 1H, 2-H, *J*₂₋₃=4.5); 2.61 (q, 1H, CH₃CHN, *J*=6.5); 1.42 (d, 3H, CH₃CHN, *J*=6.5). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 172.5 (C-1); 143.0 (C_{qar}); 128.7 (C_{ar}); 127.7 (C_{ar}); 126.5 (C_{ar}); 69.7 (C-4); 67.1 (CH₃CH); 41.5 (C-3); 40.2

(C-2); 23.4 (CH₃CH). [α]_D²⁰ –19.6 (c 0.5, CHCl₃). HRMS *m/z*: calcd for C₁₂H₁₄NO₂ [M+H]⁺: 204.1025; found: 204.1028.

11b: ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7.4–7.2 (m, 5H, H_{ar}); 4.41 (d, 1H, 4a-H, *J*_{4a-4b}=9.9); 4.26 (dd, 1H, 4b-H, *J*_{4b-4a}=9.9, *J*_{4b-3}=3.0); 2.99 (dd, 1H, 3-H, *J*₃₋₂=4.5, *J*_{3-4b}=3.0); 2.73 (q, 1H, CH₃CHN, *J*=6.5); 2.55 (d, 1H, 2-H, *J*₂₋₃=4.5); 1.48 (d, 3H, CH₃CHN, *J*=6.5). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 172.2 (C-1); 142.5 (C_{qar}); 128.6 (C_{ar}); 127.6 (C_{ar}); 126.3 (C_{ar}); 69.4 (C-4); 66.9 (CH₃CH); 42.6 (C-3); 39.0 (C-2); 23.5 (CH₃CH). [α]_D²⁰ –23.6 (c 0.4, CHCl₃). HRMS *m/z*: calcd for C₁₂H₁₄NO₂ [M+H]⁺: 204.1025; found: 204.1033.

4.2.7. (3*aR*,6*aR*)-3-((*R*)-1-Phenylethyl)dihydrofuro[3,4-*d*]oxazole-2,6(3*H*,6*aH*)-dione (**12a**) and (3*aS*,6*aS*)-3-((*R*)-1-phenylethyl)dihydrofuro[3,4-*d*]oxazole-2,6(3*H*,6*aH*)-dione (**12b**). The protocol used for the synthesis of **3** (method B) was applied to the mixture of aziridine lactones **11a** and **11b** (178 mg, 0.874 mmol) and methyl chloroformate (104 μ L, 1.31 mmol) in CH₃CN (3 mL) to give after chromatography (CH₂Cl₂/EtOAc 1:9) oxazolidinone **12a** (55 mg, 25%) and oxazolidinone **12b** (55 mg, 25%).

12a: ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7.45–7.25 (m, 5H, H_{ar}); 5.22 (q, 1H, CH₃CHN, *J*=7.3); 4.83 (d, 1H, 2-H, *J*₂₋₃=8.3); 4.47 (dd, 1H, 4a-H, *J*_{4a-4b}=10.6, *J*_{4a-3}=1.5); 4.34 (dd, 1H, 4b-H, *J*_{4b-4a}=10.6, *J*_{4b-3}=5.1); 4.22 (ddd, 1H, 3-H, *J*₃₋₂=8.3, *J*_{3-4b}=5.1, *J*_{3-4a}=1.5); 1.68 (d, 3H, CH₃CHN, *J*=7.3). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 170.5 (C-1); 155.9 (C=O); 137.6 (C_{qar}); 129.2 (C_{ar}); 128.7 (C_{ar}); 127.2 (C_{ar}); 71.3 (C-4); 69.8 (C-2); 54.1 (C-3); 53.5 (CH₃CH); 18.6 (CH₃CH). [α]_D²⁰ +0.9 (c 1.0, CHCl₃). HRMS *m/z*: calcd for C₁₃H₁₄NO₄ [M+H]⁺: 248.0935; found: 248.0923.

12b: ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7.45–7.3 (m, 5H, H_{ar}); 5.21 (q, 1H, CH₃CHN, *J*=7.1); 4.95 (d, 1H, 2-H, *J*₂₋₃=8.3); 4.62 (ddd, 1H, 3-H, *J*₃₋₂=8.3, *J*_{3-4a}=5.1, *J*_{3-4b}=1.4); 3.96 (dd, 1H, 4a-H, *J*_{4a-4b}=10.9, *J*_{4a-3}=5.1); 3.47 (dd, 1H, 4b-H, *J*_{4b-4a}=10.9, *J*_{4b-3}=1.4); 1.67 (d, 3H, CH₃CHN, *J*=7.1). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 170.4 (C-1); 155.7 (C=O); 138.9 (C_{qar}); 129.3 (C_{ar}); 128.8 (C_{ar}); 127.0 (C_{ar}); 69.9 (C-2); 69.8 (C-4); 53.5 (C-3); 52.7 (CH₃CH); 15.7 (CH₃CH). [α]_D²⁰ –180.8 (c 0.9, CHCl₃). HRMS *m/z*: calcd for C₁₃H₁₄NO₄ [M+H]⁺: 248.0929; found: 248.0923.

4.2.8. (3*aS*,6*S*,6*aS*)-6-Ethyltetrahydrofuro[3,4-*d*]oxazol-2(3*H*)-one ((+)-**9**). The protocol used for the synthesis of **9** was applied to PMB-protected compound (+)-**8** (41 mg, 0.093 mmol) and CAN (310 mg, 0.56 mmol) in CH₃CN/H₂O (9:1) (3 mL) to give the compound (+)-**9** (20 mg, 66%). All analyses were in agreement with the data reported in the literature.^{8d} [α]_D²⁰ +65.0 (c 0.8, CHCl₃) [Lit.^{8d} [α]_D²⁰ +66.5 (c 1.2, CHCl₃)].

4.2.9. (2*S*,3*S*,4*S*)-4-Amino-2-tetradecyltetrahydrofuran-3-ol (jaspine B). The protocol used for the synthesis of racemic jaspine B was applied to oxazolidinone (+)-**9** (20 mg, 0.062 mmol) and KOH (34.5 mg, 0.62 mmol) in EtOH/H₂O (8:2) (1.5 mL) to give jaspine B (17 mg, 92%). All analyses were in agreement with the data reported in the literature.^{8d} [α]_D²⁰ +18.8 (c 0.85, EtOH) [Lit.¹ [α]_D²⁰ +18 (c 0.1, EtOH)].

4.2.10. (3*aR*,6*R*,6*aR*)-6-Ethyltetrahydrofuro[3,4-*d*]oxazol-2(3*H*)-one ((–)-**9**). The protocol used for the synthesis of **9** was applied to PMB-protected compound (–)-**8** (41 mg, 0.093 mmol) and CAN (310 mg, 0.56 mmol) in CH₃CN/H₂O (9:1) (3 mL) to give the compound (–)-**9** (20 mg, 66%). NMR spectral data and mass spectroscopy were identical to those of compound (+)-**9**. [α]_D²⁰ –65.7 (c 1.0, CHCl₃).

4.2.11. (2*R*,3*R*,4*R*)-4-Amino-2-tetradecyltetrahydrofuran-3-ol (ent-jaspine B). The protocol used for the synthesis of jaspine B was applied to oxazolidinone (–)-**9** (20 mg, 0.062 mmol) and KOH (34.5 mg, 0.62 mmol) in EtOH/H₂O (8:2) (1.5 mL) to give ent-jaspine B (16 mg, 87%). NMR spectral data and mass spectroscopy were

identical to those of jaspine B. $[\alpha]_D^{20} -19.0$ (c 0.8, EtOH) [Lit.^{10c} $[\alpha]_D^{20} -17.7$ (c 0.4, EtOH)].

4.3. Separation of enantiomers of (\pm)-8

Chemicals. Solvents used were HPLC grade methanol (MeOH) and dichloromethane (CH_2Cl_2) provided by Carlo Erba Reagents (France). Carbon dioxide was provided by Linde (France).

Samples preparation. 58 mg in 2.0 mL of CH_2Cl_2 , the concentration was 30 g/L.

Apparatus and operating conditions. The separation of both enantiomers and the analysis of purified fractions were carried out using manufactured equipment with three model HPLC K-501 Knauer pumps, two used for carbon dioxide and one for the modifier. Control of the mobile phase composition was performed by the modifier pump. The pump head used for pumping the carbon dioxide was cooled to -10°C by a cryostat (Minichiller, Huber). The injector valve was supplied with a 50 μL loop. The autosampler HT300L allowed from 1 to 500 μL injection volumes. The columns were thermostated by an oven regulated at 35°C . A Chiralpak IC column (5 μm silica particles immobilized with cellulose tris-(3,5-dichlorophenylcarbamate), 250×4.6 mm for analytical scale and 250×10 mm for preparative scale) was used with a 25% of a $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ mixture (80:20, v/v) as an additive in a CO_2 mobile phase. The flowrate was 4 mL for analytical scale and 12 mL/min for preparative scale and the outlet pressure was 100 bars.

The detector was Smartline UV 2600 Knauer detector. UV detection was carried out at 270 nm. Injection volumes were 10 μL for analytical scale and 50 μL for preparative scale.

Both isomers were obtained with an enantiomeric purity superior to 99.5% in the re-analysis (see ESD) and in 80% yield (23 mg).

4.4. Biological evaluation

For cytotoxicity evaluation, 3000 cells (HCT116, GM637H or U2OS) were seeded per wells in 96-wells plates and, 24 h later, were treated with concentrations ranging from 10 nM to 50 μM (8 replicates for each) for jaspine B and from 175 nM to 100 μM (8 replicates for each) for *ent*-jaspine B. After 4 days of treatment, cells were incubated with the cell proliferation reagent WST-1 (Roche) for 3–4 h and the absorbance was then measured with a scanning multi-well spectrophotometer at 450 nm. The measured absorbance directly correlates to the number of viable cells. Data were analyzed using Prism softwares.

Acknowledgements

The chiral chromatography separation was carried out on the equipment of the technical platform of the Institute of Chemistry of Toulouse (ICT—FR CNRS 2599).

The biological evaluations were carried out by the Platform of biological activities evaluation at ITAV-USR35005, Centre Pierre Potier in Toulouse.

Supplementary data

Copies of ^1H and ^{13}C NMR spectra of new compounds, supplementary crystallographic data and analytical chiral HPLC chromatograms. Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2013.06.091>.

References and notes

- Kuroda, I.; Musman, M.; Ohtani, I.; Ichiba, T.; Tanaka, J.; Gravalos, D. G.; Higa, T. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1505–1506.
- Ledroit, V.; Debitus, C.; Lavaud, C.; Massiot, G. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 225–228.
- Salma, Y.; Lafont, E.; Therville, N.; Carpentier, S.; Bonnafé, M. J.; Levade, T.; Génisson, Y.; Andrieu-Abadie, N. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *78*, 477–485.
- (a) Canals, D.; Mormeneo, D.; Fabrias, G.; Llebaria, A.; Casas, J.; Delgado, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 235–241; (b) Yoshimitsu, Y.; Oishi, S.; Miyagaki, J.; Inuki, S.; Ohno, H.; Fujii, N. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 5402–5408; (c) Yoo, H.; Lee, Y. S.; Lee, S.; Kim, S.; Kim, T. Y. *Phytother. Res.* **2012**, *26*, 1927–1933.
- Shin, D. H.; Kim, T. Y. U.S. Patent, US 2012/0071424 A1, 2012.
- For reviews see: (a) Abraham, E.; Davies, S. G.; Roberts, P. M.; Russell, A. J.; Thomson, J. E. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1027–1047; (b) Ballereau, S.; Baltas, M.; Génisson, Y. *Curr. Org. Chem.* **2011**, *15*, 953–986.
- (a) Inuki, S.; Yoshimitsu, Y.; Oishi, S.; Fujii, N.; Ohno, H. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4478–4481; (b) Urano, H.; Enomoto, M.; Kuwahara, S. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2010**, *74*, 152–157; (c) Inuki, S.; Yoshimitsu, Y.; Oishi, S.; Fujii, N.; Ohno, H. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3831–3842; (d) Vichare, P.; Chattopadhyay, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 1983–1987; (e) Srinivas Rao, G.; Venkateswara Rao, B. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 6076–6079; (f) Passiniemi, M.; Koskinen, A. M. P. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1774–1783; (g) Yoshimitsu, Y.; Inuki, S.; Oishi, S.; Fujii, N.; Ohno, H. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3843–3846; (h) Llavera, J.; Díaz, Y.; Matheu, M. I.; Castillón, S. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 1514–1519; (i) Bae, H.; Jeon, H.; Baek, D.; Kim, S. *Synthesis* **2012**, *44*, 3609–3612; (j) Yoshimitsu, Y.; Miyagaki, J.; Oishi, S.; Fujii, N.; Ohno, H. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 4211–4220; (k) Srinivas Rao, G.; Chandrasekhar, B.; Venkateswara Rao, B. *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, *23*, 564–569.
- (a) Chandrasekhar, S.; Tiwari, B.; Prakash, S. J. *Arkivoc* **2006**, 155–161; (b) Génisson, Y.; Lamande, L.; Salma, Y.; Andrieu-Abadie, N.; Andre, C.; Baltas, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 857–864; (c) Rives, A.; Ladeira, S.; Levade, T.; Andrieu-Abadie, N.; Génisson, Y. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 7920–7923; (d) Salma, Y.; Ballereau, S.; Maaliki, C.; Ladeira, S.; Andrieu-Abadie, N.; Génisson, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 3227–3243; (e) Ballereau, S.; Andrieu-Abadie, N.; Saffon, N.; Génisson, Y. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 2570–2578; (f) Jeon, H.; Bae, H.; Baek, D.; Kwak, Y.-S.; Kim, D.; Kim, S. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7237–7242; (g) Salma, Y.; Ballereau, S.; Ladeira, S.; Lepetit, C.; Chauvin, R.; Andrieu-Abadie, N.; Génisson, Y. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 4253–4262.
- (a) Jayachitra, G.; Sudhakar, N.; Anchoori, R. K.; Rao, B. V.; Roy, S.; Banerjee, R. *Synthesis* **2010**, 115–119; (b) Sudhakar, N.; Kumar, A. R.; Prabhakar, A.; Jagadeesh, B.; Rao, B. V. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 325–327; (c) Abraham, E.; Candela-Lena, J. I.; Davies, S. G.; Georgiou, M.; Nicholson, R. L.; Roberts, P. M.; Russell, A. J.; Sanchez-Fernandez, E. M.; Smith, A. D.; Thomson, J. E. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2510–2513; (d) van den Berg, R.; Boltje, T. J.; Verhagen, C. P.; Litjens, R.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 836–839; (e) Abraham, E.; Brock, E. A.; Candela-Lena, J. I.; Davies, S. G.; Georgiou, M.; Nicholson, R. L.; Perkins, J. H.; Roberts, P. M.; Russell, A. J.; Sanchez-Fernandez, E. M.; Scott, P. M.; Smith, A. D.; Thomson, J. E. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1665–1673; (f) Abraham, E.; Brock, E. A.; Candela-Lena, J. I.; Davies, S. G.; Georgiou, M.; Nicholson, R. L.; Perkins, J. H.; Roberts, P. M.; Russell, A. J.; Sanchez-Fernandez, E. M.; Scott, P. M.; Smith, A. D.; Thomson, J. E. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 4668; (g) Reddipalli, G.; Venkataiah, M.; Mishra, M. K.; Fadnavis, N. W. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 1802–1805; (h) Sanchez-Eleuterio, A.; Quintero, L.; Sartillo-Piscil, F. J. *Org. Chem.* **2011**, *76*, 5466–5471; (i) Lee, D. *Synlett* **2012**, 2840–2844.
- (a) Ramana, C. V.; Giri, A. G.; Suryawanshi, S. B.; Gonnade, R. G. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 265–268; (b) Cruz-Gregorio, S.; Espinoza-Rojas, C.; Quintero, L.; Sartillo-Piscil, F. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 6370–6371; (c) Prasad, K. R.; Penchalaiah, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22*, 1400–1403.
- (a) Valle, M. S.; Saraiva, M. F.; Retaileau, P.; de Almeida, M. V.; Dodd, R. H. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 5592–5599; (b) Dauban, P.; de Saint-Fuscien, C.; Dodd, R. H. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 7589–7600; (c) Dubois, L.; Mehta, A.; Tourette, E.; Dodd, R. H. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 434–441.
- (a) Tarrade, A.; Dauban, P.; Dodd, R. H. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9521–9524; (b) Tarrade-Matha, A.; Valle, M. S.; Tercinier, P.; Dauban, P.; Dodd, R. H. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 673–686; (c) Valle, M. S.; Tarrade-Matha, A.; Dauban, P.; Dodd, R. H. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 419–432.
- Stankovic, S.; D'Hooghe, M.; Catak, S.; Eum, H.; Waroquier, M.; Van Speybroeck, V.; De Kimpe, N.; Ha, H.-J. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 643–665.
- Sim, T. B.; Kang, S. H.; Lee, K. S.; Lee, W. K.; Yun, H.; Dong, Y. K.; Ha, H. J. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 104–108.
- Baudin, J. B.; Hareau, G.; Julia, S. A.; Ruel, O. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1175–1178.
- (a) Gueyrard, D.; Haddoub, R.; Salem, A.; Bacar, N. S.; Goekjian, P. G. *Synlett* **2005**, 520–522; (b) Bourdon, B.; Corbet, M.; Fontaine, P.; Goekjian, P. G.; Gueyrard, D. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 747–749; (c) Tomas, L.; Bourdon, B.; Caille, J. C.; Gueyrard, D.; Goekjian, P. G. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 915–920.
- Pospisil, J. I.; Sato, H. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 2269–2272.
- The stereochemistry of the double bond was established by analogy with compounds described in the literature (Ref. 7c).
- Tomas, L.; Boije af Gennäs, G.; Hiebel, M. A.; Hampson, P.; Gueyrard, D.; Pelotier, B.; Yli-Kauhalauma, J.; Piva, O.; Lord, J. M.; Goekjian, P. G. *Chem.—Eur. J.* **2012**, *18*, 7452–7466.
- Tomas, L.; Gueyrard, D.; Goekjian, P. G. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 4599–4601.
- Taylor, L. T. *J. Supercrit. Fluids* **2009**, *47*, 566–573.
- Miller, L.; Potter, M. J. *Chromatogr. B* **2008**, *875*, 230–236.
- Ren-Qi, W.; Teng-Teng, O.; Siu-Choon, N.; Weihua, T. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2012**, *37*, 83–100.
- (a) SAINT-NT; Bruker AXS: Madison, WI; (b) SADABS, P. f. d. c., Bruker-AXS.
- Sheldrick, G. *Acta Crystallogr., Sect. A* **2008**, *64*, 112–122.

IV. Synthèse de sondes fluorescentes de la jaspine B : vers une compréhension de son mode d'action

Afin d'étudier le mode d'action cellulaire de la jaspine B, nous avons développé des sondes fluorescentes de la jaspine B basées sur les synthèses de la jaspine B développées au laboratoire. D'après la relation structure-activité observée sur cette famille de composés, la cytotoxicité de la jaspine est optimale lorsque le composé possède une configuration (2*S*,3*S*,4*S*), une longue chaîne alkyle insaturée ou non, et l'amine primaire libre. Le marquage de la jaspine B est donc réalisé en bout de chaîne (cf. Figure 6).

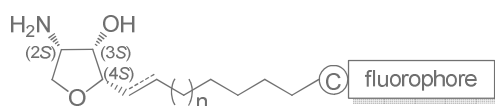


Figure 6 - Structure des sondes fluorescentes de la jaspine B

Ces sondes sont accessibles à partir de deux intermédiaires polyvalents (**210**) et (**214**), utilisés au laboratoire. Dans la première stratégie, l'insertion de la chaîne aliphatique ω -marquée est réalisée par métathèse croisée avec l'oxazolidinone vinylique (**210**), permettant ainsi d'accéder aux sondes jaspine ω -marquées insaturée et saturée. Dans la seconde stratégie, une oléfination de Julia⁶⁶⁻⁶⁹ avec l'oxazolidinone lactone (**214**) donne accès à une jaspine ω -aminée. La présence d'une amine en bout de chaîne, connue pour ne pas entraîner de perte significative de cytotoxicité (cf. composé (**25**)²²), sert de connecteur (C, sur la Figure 6) pour introduire le groupement fluorophore.

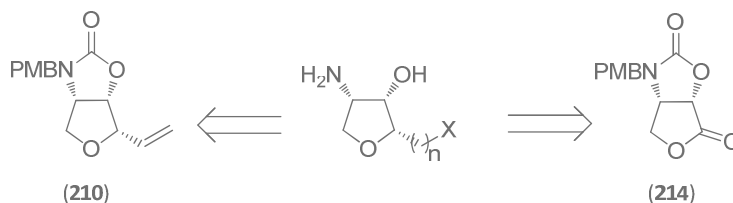


Schéma 33 - Voies d'accès aux sondes ω -marquées de la jaspine B

Ces deux stratégies ainsi que les résultats préliminaires d'imagerie de fluorescence sont développées dans la suite de ce chapitre.

1) Synthèse à partir de l'oxazolidinone vinylique (**210**)

La première stratégie d'accès aux jaspines ω -marquées insaturée et saturée, repose sur une réaction de métathèse croisée entre un synthon éthylénique ω -marqué (en rose sur le Schéma 34) et un synthon tétrahydrofurane vinylique (en bleu sur le Schéma 34), dérivant de l'oxazolidinone vinylique (**210**).

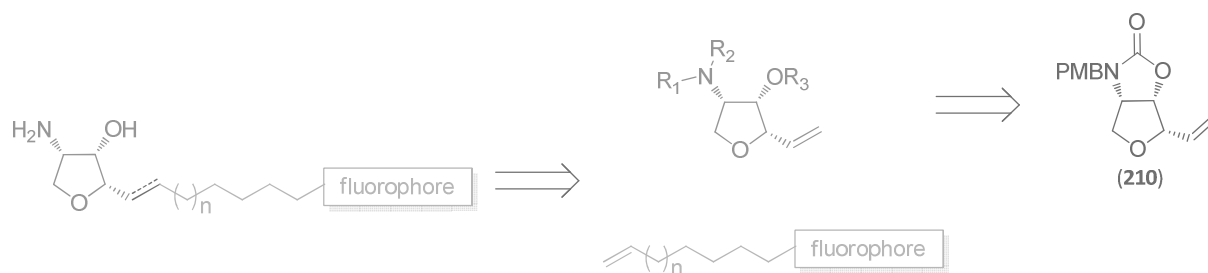


Schéma 34 - Schéma rétrosynthétique de la sonde jaspine B à partir de (210)

- *Synthèse du synthon éthylénique ω -BODIPY*

Dans un premier temps, le synthon éthylénique ω -marqué a été préparé. Notre choix s'est porté sur le fluorophore 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène (BODIPY), découvert en 1968 par A. Treibs et F.H. Kreuzer.⁷⁰ Les BODIPYs sont connus pour être de bons candidats pour le développement de sondes dans des milieux biologiques du fait de leurs bonnes propriétés fluorescentes (haut rendement quantique, fort coefficient d'extinction et photostabilité),^{71, 72} de leur bonne stabilité en milieu physiologique,⁷³ de leur faible toxicité,⁷⁴ de leurs bonnes propriétés lipophiles et de leur faible polarité permettant la pénétration membranaire.⁷⁵

Deux voies d'accès au motif BODIPY sont reportées dans la littérature. La première stratégie consiste à condenser un aldéhyde avec un pyrrole pour former l'intermédiaire dipyrrométhane. Un excès de pyrrole est utilisé pour éviter la polymérisation.⁷⁶ L'oxydation du dipyrrométhane conduit au dipyrrométhène. Le BODIPY est obtenu après complexation du dipyrrométhène avec BF_3OEt_2 en présence de base (cf. Schéma 35).

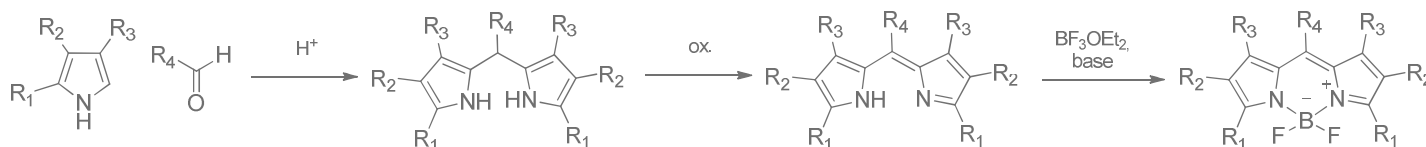


Schéma 35 - Synthèse de BODIPY symétriques à partir de pyrroles et d'aldéhydes

La seconde stratégie permet d'éviter l'étape d'oxydation pour former le dipyrrométhène. Le pyrrole est d'abord condensé sur un chlorure d'acide⁷⁷⁻⁷⁹ ou anhydride,⁸⁰ puis le dipyrrométhène résultant est complexé pour donner le BODIPY symétrique (cf. Schéma 36).

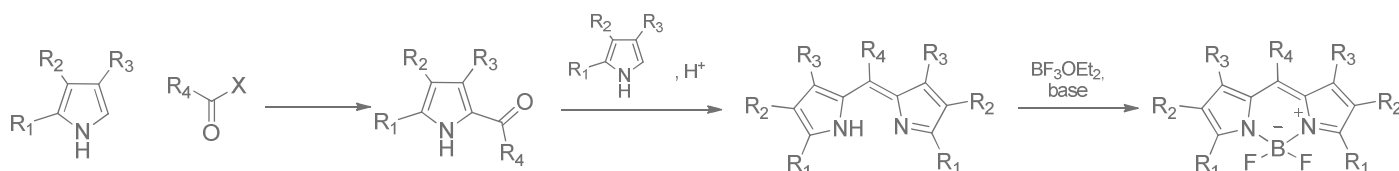


Schéma 36 - Synthèse de BODIPY à partir de pyrroles et de chlorure d'acides ou anhydrides

Une alternative à cette voie de synthèse est l'utilisation d'intermédiaire cétopyrrole pour la préparation de BODIPY symétriques ou asymétriques.^{79, 81} Ce cétopyrrole est préparé selon la méthode de A. Fürstner par acylation de sels de magnésium du pyrrole avec un 2-pyridylthioester dérivant de l'acide carboxylique correspondant (cf. Schéma 37).⁸²

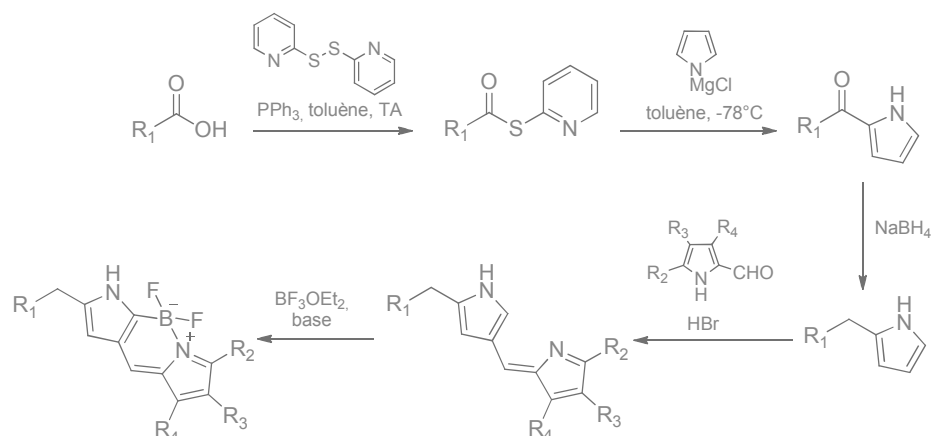


Schéma 37 - Synthèse de BODIPY asymétrique à partir du cétopyrrole par la méthode de A. Fürstner

Le cétopyrrole est alors condensé sur lui-même ou un autre pyrrole. Cette condensation peut être réalisée en présence d'acide bromhydrique (cf. Schéma 37) ou de trichlorure de phosphore (cf. Schéma 38).^{72, 83}

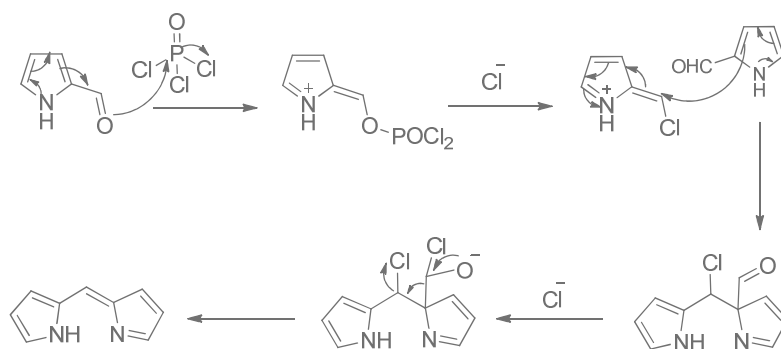
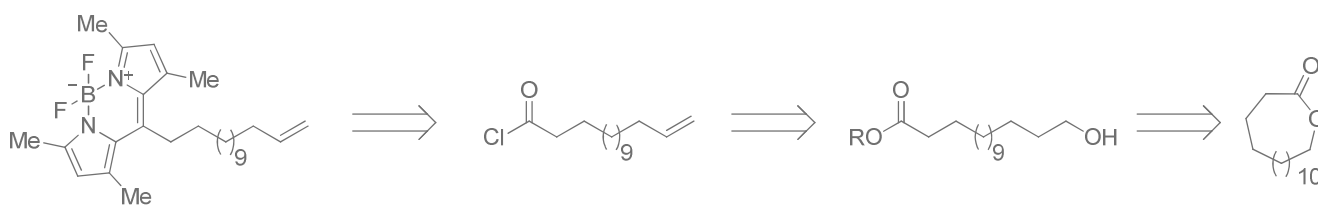


Schéma 38 - Mécanisme proposé par K. Burgess pour la condensation des cétopyrroles en présence de trichlorure de phosphore pour la formation de dipyrrométhènes

Notre synthèse de la chaîne éthylénique ω -BODIPY s'est appuyée sur la procédure « one-pot » décrite par P. Nussbaumer,⁷⁹ faisant intervenir la condensation d'un chlorure d'acide et d'un pyrrole, puis complexation du dipyrrométhène. Pour accéder au chlorure d'acide, nous avons suivi la procédure de J. Katzenellenbogen à partir de la ω -pentadécalactone (cf. Schéma 39).⁸⁴

Schéma 39 - Rétrosynthèse du synthon éthylénique ω -BODIPY

Ainsi, l'ouverture de la ω -pentadécalactone en milieu acide dans le méthanol conduit au ω -hydroxyméthylester (**220**). Ce dernier est converti en ω -bromoester (**221**) en présence de triphénylphosphine et NBS. L'ajout de *tert*-butanolate de potassium sur le composé (**221**) entraîne l'élimination du brome et une transestérification. Le traitement au TFA du *tert*-butylester ω -insaturé (**222**) résultant donne accès à l'acide ω -éthylénique (**223**) désiré. Ce dernier est ensuite converti en « one-pot » en chlorure d'acide, puis en dipyrrométhène et enfin en BODIPY (**224**) par complexation du

dipyrrométhène par le BF_3OEt_2 . Le synthon (**224**) a ainsi été obtenu avec un rendement global de 2% à partir de la ω -pentadécalactone (cf. Schéma 40).

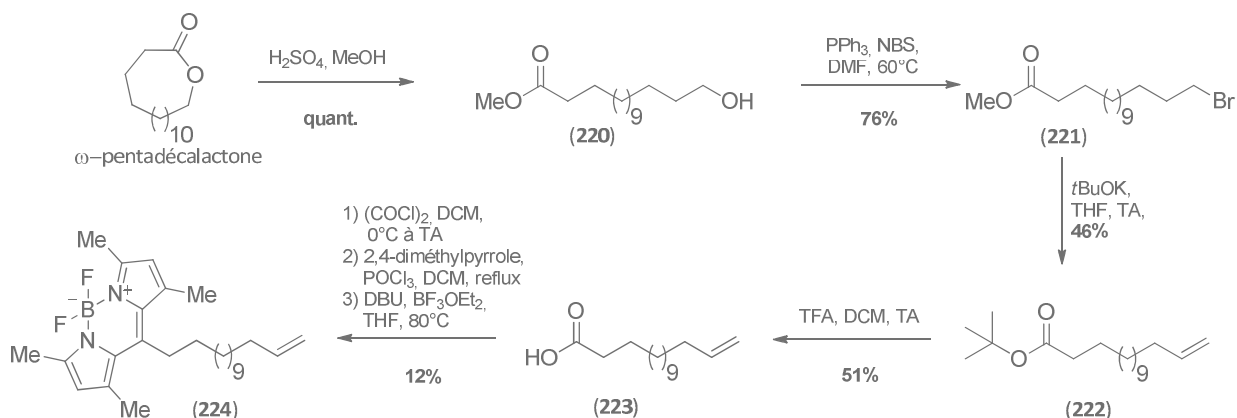


Schéma 40 - Synthèse de la chaîne éthylénique ω -BODIPY (**224**)

- *Synthèse du synthon tétrahydrofurane vinylique*

En parallèle, les groupements protecteurs de l'oxazolidinone vinylique (**210**) sont remplacés pour être compatibles avec la suite de la synthèse (cf. Schéma 41). En effet, les conditions d'hydrolyse de l'oxazolidinone étant drastiques, celle-ci doit être réalisée avant l'introduction de groupements trop sensibles.

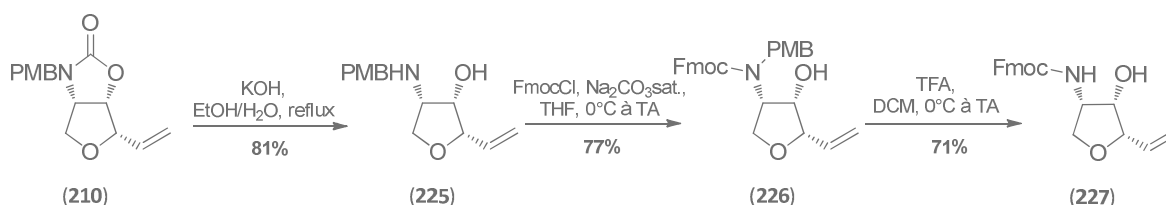


Schéma 41 - Aménagement des groupements protecteurs de (**210**)

Ainsi, l'oxazolidinone (**210**) est hydrolysée en condition basique à reflux de l'éthanol. L'amine (**225**) est protégée par un groupement fluorénylméthylcarbamate (Fmoc), puis le groupement paraméthoxybenzyle (PMB) de l'intermédiaire (**226**) est clivé en conditions acides pour donner le composé (**227**) avec un rendement global de 44% à partir du composé (**210**).

- *Synthèse de la sonde jaspine B-BODIPY*

Le BODIPY ω -insaturé (**224**) est ensuite engagé dans une réaction de métathèse croisée avec le synthon vinylique (**227**) (cf. Schéma 42). Cette réaction a été utilisée au laboratoire,⁷ ainsi que par A.M. Koskinen^{30, 31} et A.K. Shaw³⁶ pour la synthèse de la jaspine B avec le catalyseur Grubbs II. De même, P. Nussbaumer prépare des sphingosines ω -BODIPY par métathèse avec le catalyseur Grubbs II.⁷⁹ En 2013, J. Atkinson compare différents catalyseurs au ruthénium pour la métathèse entre des chaînes alcéniques ω -BODIPY et le vinylchromanol pour donner des analogues de la vitamine E ω -BODIPY.⁸¹ Les meilleures conversions sont alors obtenues avec le catalyseur Grubbs-Hoveyda II.

Ainsi, la jaspine B insaturée ω -BODIPY (**228**) a été obtenue par métathèse croisée entre les intermédiaires (**227**) et (**224**) avec le catalyseur Grubbs-Hoveyda II. Le produit de dimérisation bis-BODIPY n'a pas été observé.

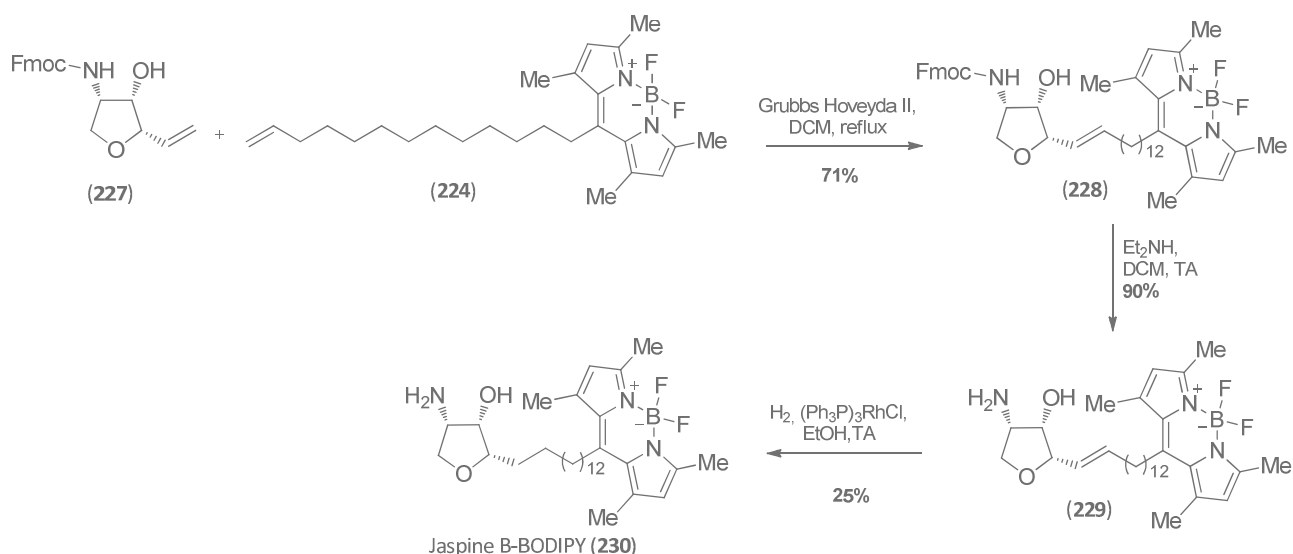


Schéma 42 – Synthèse de la Jaspine B-BODIPY-C18 (**230**) par métathèse croisée

La déprotection du groupement Fmoc de l'intermédiaire (**228**) conduit à la jaspine B-BODIPY insaturée (**229**). Le composé (**229**) s'est révélé instable, probablement à cause de l'insaturation pouvant être à l'origine de la polymérisation observée sur ce composé, le rendant difficilement caractérisable.

La double liaison de (**229**) est alors réduite en présence d'hydrogène à pression atmosphérique et du catalyseur de Wilkinson, choisi pour limiter la décomposition du fluorophore.^{81, 82} Malgré l'utilisation de ce catalyseur, le composé (**229**) est partiellement dégradé au cours de l'hydrogénation. Les conditions de réduction seront à optimiser par la suite pour améliorer le rendement de cette étape. La jaspine B-BODIPY (**230**) a pu ainsi être isolée et partiellement caractérisée, sa stabilité restant modérée.

Cette synthèse nous a permis d'accéder à la jaspine B-BODIPY (**230**) avec un rendement global de 7% sur 6 étapes à partir de la jaspine vinylique (**210**). Cette voie pourra être utilisée par la suite pour développer des jaspines B ω -BODIPY avec des longueurs de chaînes variables à partir de différents acides carboxyliques ω -insaturés.

2) Synthèse à partir de l'oxazolidinone lactone (**214**)

La deuxième stratégie mise en œuvre pour accéder à des sondes jaspine B ω -marquée repose sur une oléfination de Julia entre l'oxazolidinone lactone (**214**) et la sulfone (**231**).

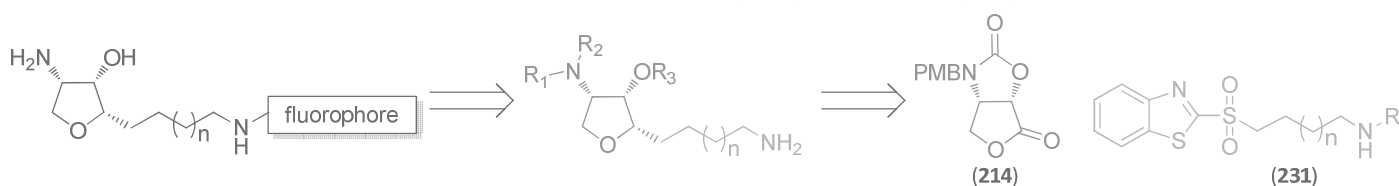
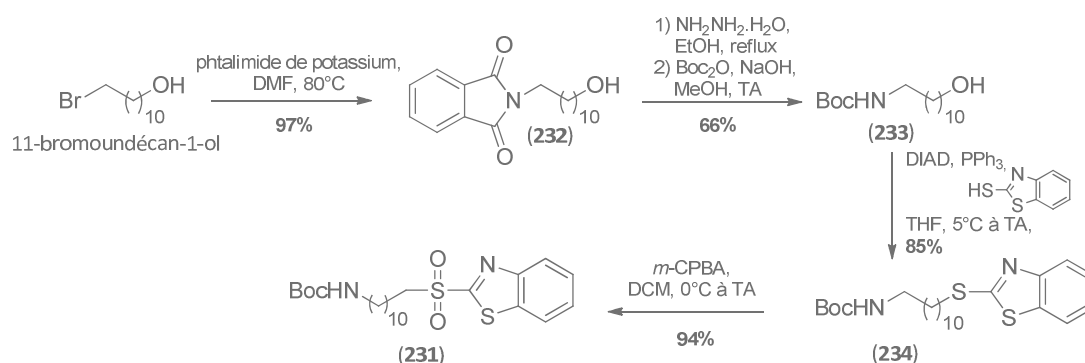


Schéma 43 - Schéma rétrosynthétique de la sonde jaspine B à partir de (**214**)

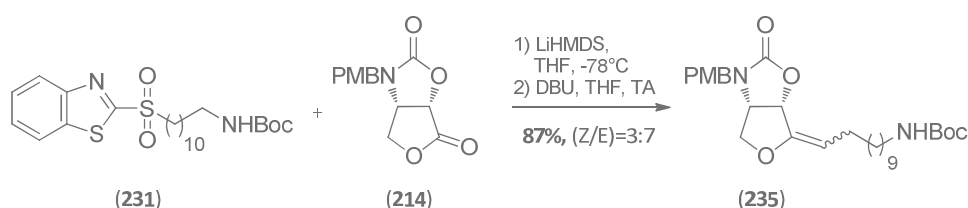
- *Synthèse de la sulfone (231)*

Du fait de sa disponibilité commerciale, et une longueur de chaîne suffisante pour maintenir la cytotoxicité de la jaspine, le 11-bromoundécane-1-ol a été sélectionné pour accéder à la sulfone (**231**). Dans un premier temps, le 11-bromoundécane-1-ol est engagé dans une réaction de Gabriel dans les conditions décrites par F. Zerbetto, puis l'intermédiaire phthalimide (**232**) est traité par l'hydrazine suivi du di-*tert*-butyl dicarbonate pour donner l'aminoalcool (**233**).⁸⁵ La réaction de Mitsunobu du composé (**233**) avec le 2-mercaptobenzothiazole (BTSH) dans les conditions décrites par M.S. Baird conduit au sulfure (**234**),⁸⁶ qui après oxydation par l'acide *m*-chloroperoxybenzoïque⁸⁷ fournit la sulfone (**231**). Celle-ci est donc obtenue avec un rendement global de 51% à partir du 11-bromoundécane-1-ol (cf. Schéma 44).

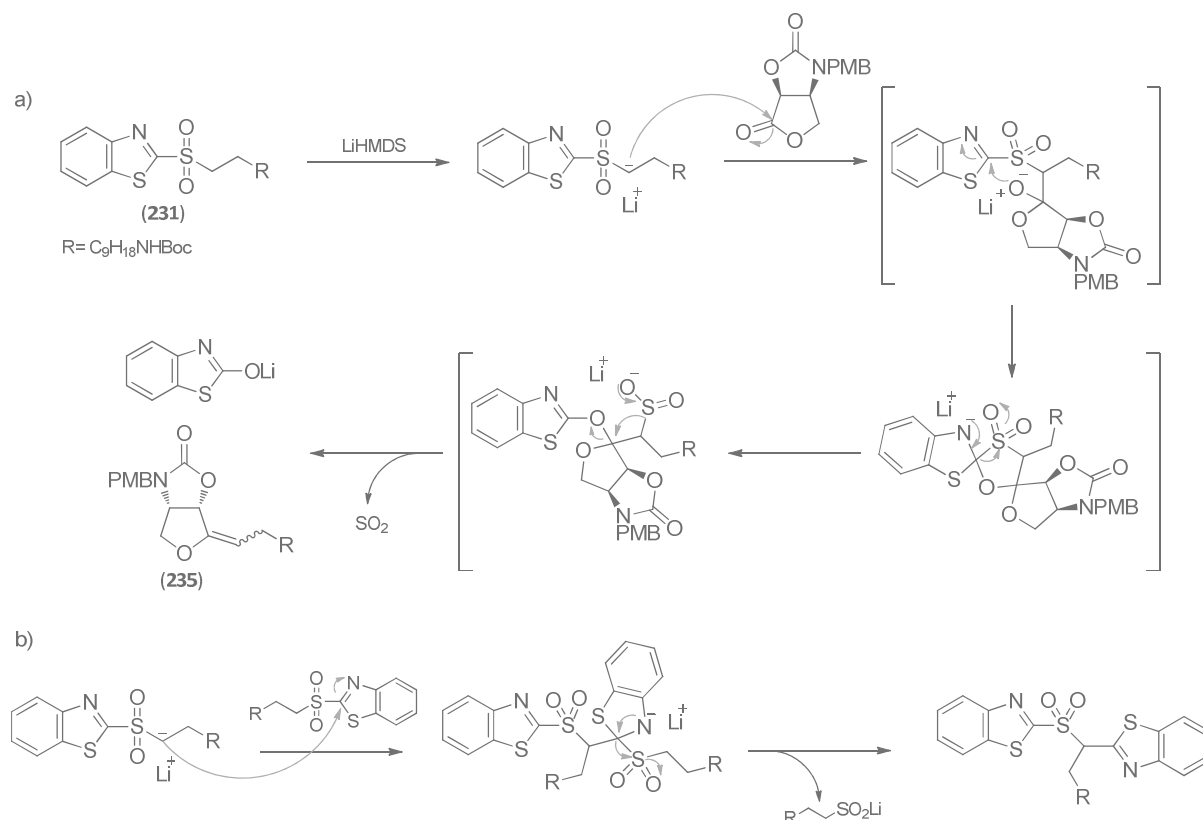
Schéma 44 - Synthèse de la sulfone (**231**) à partir du 11-bromoundécane-1-ol

- *Couplage de Julia entre la sulfone (231) et l'oxazolidinone lactone (214)*

De façon similaire à la synthèse de la jaspine B (cf. paragraphe III de ce chapitre), la chaîne ω -aminée est insérée sur l'oxazolidinone lactone (**214**) par une oléfination de Julia modifiée avec la sulfone (**231**), dans les conditions décrites par D. Gueyraud.⁶⁹

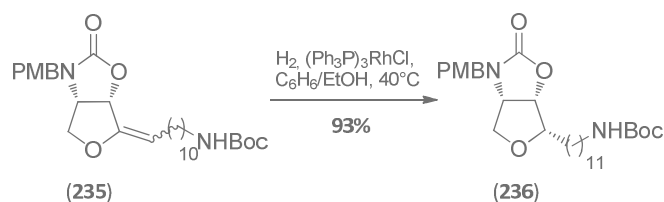
Schéma 45 - Couplage de Julia sur l'oxazolidinone lactone (**214**) et la sulfone (**231**)

L'éther d'énol (**235**) est ainsi obtenu avec un rendement de 87% et un rapport Z/E de 3:7. Contrairement aux résultats de J.M. Lord et P.G. Goekjian sur le couplage de Julia pour accéder à la bistramide A,⁸⁸ et à nos résultats lors de la synthèse de la jaspine B,¹⁵ aucun produit d'hydratation n'a été observé. Une faible portion du dimère de la sulfone a été obtenue. Ce dimère est issu d'une réaction de condensation de la sulfone (**231**) sur elle-même en compétition avec la réaction de couplage entre (**214**) et la sulfone (**231**).^{66, 89} Le mécanisme de ces réactions est détaillé ci-après (cf. Schéma 46).

Schéma 46 - a) Mécanisme de la réaction de Julia entre l'oxazolidinone lactone (**214**) et la sulfone (**231**);

b) Mécanisme de condensation de la sulfone sur elle-même

- Hydrogénation de l'éther d'énol (**235**)

Schéma 47 - Hydrogénation de l'éther d'énol (**235**)

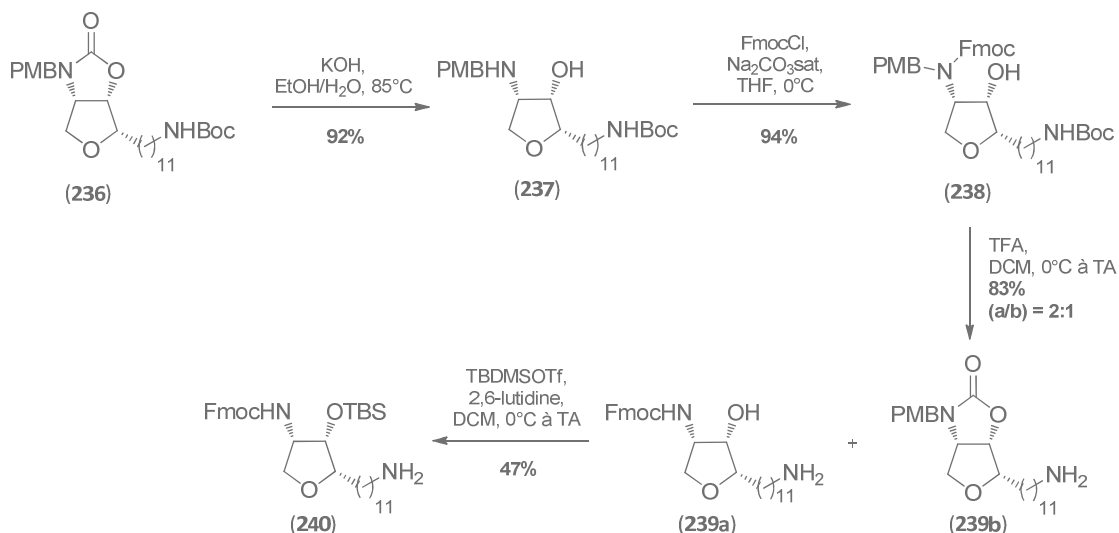
Tout comme pour la synthèse de la jaspine B, l'éther d'énol (**235**) est hydrogéné en présence du catalyseur de Wilkinson³³ pour donner l'oxazolidinone (**236**) de façon totalement diastéréosélective et avec un rendement de 93%.

- Fonctionnalisation de l'oxazolidinone (**236**)

De la même façon que lors de la synthèse de la jaspine B-BODIPY, un aménagement des groupements protecteurs est nécessaire pour insérer sélectivement le fluorophore sur l'amine en bout de chaîne.

L'oxazolidinone (**236**) est hydrolysée en milieu basique, puis l'amine du composé résultant (**237**) est protégée par un groupement Fmoc. Les groupements PMB et Boc de l'intermédiaire (**238**) sont clivés en présence de TFA pour donner le composé (**239a**) ainsi que l'oxazolidinone (**239b**). Seul un

exemple de cette réaction secondaire entraînant une cyclisation intramoléculaire en oxazolidinone est rapporté dans la littérature.⁹⁰ Les composés **(239a)** et **(239b)** sont difficilement séparables par chromatographie. La silylation du mélange **(239)** permet d'isoler la jaspine B ω -aminée **(240)**, convenablement protégée pour l'insertion d'un fluorophore, avec un rendement global de 34%



depuis **(236)** (cf. Schéma 48).

Schéma 48 - Fonctionnalisation du composé **(236)**

Afin d'éviter la formation de l'oxazolidinone **(239b)**, l'ordre des étapes de protection est inversé (cf. Schéma 49). Le groupement PMB est clivé en conditions oxydantes, puis l'oxazolidinone **(241)** est hydrolysée en milieu basique. L'hydroxyle du composé **(242)** est alors silylé, puis la fonction amine de **(243)** est protégée par un groupement Fmoc. Le traitement au TFA de l'intermédiaire **(244)** permet la déprotection de l'amine en bout de chaîne. La jaspine ω -aminée **(240)** est ainsi obtenue avec un rendement global de 49% depuis **(236)**.

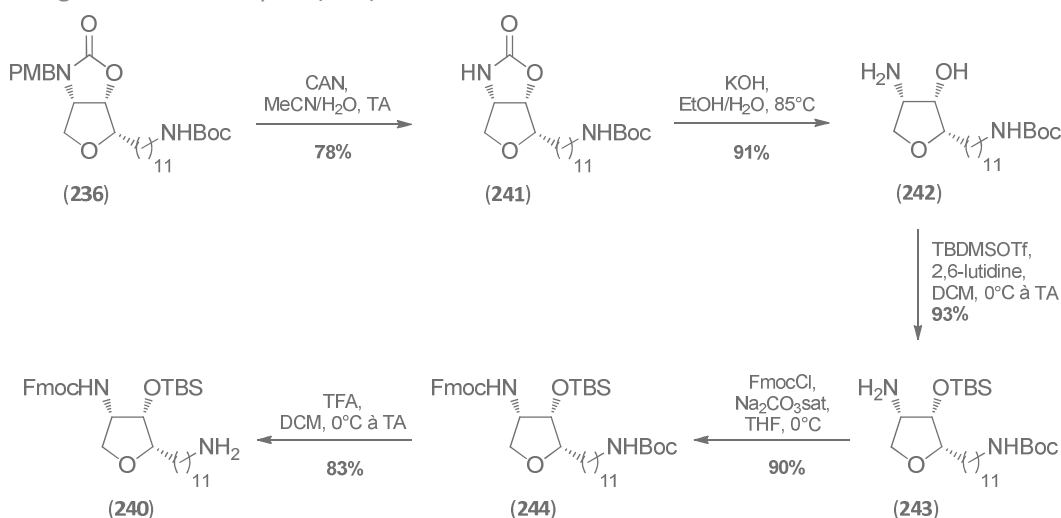
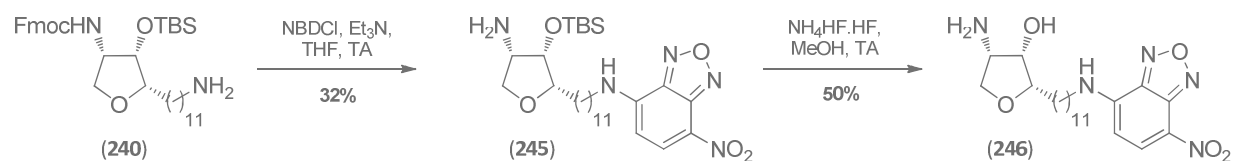


Schéma 49 – Alternative d'aménagement des groupes protecteurs sur l'oxazolidinone **(236)**

- *Marquage de la jaspine (240)*

Les groupements protecteurs de l'analogue (**240**) de la jaspine B sont convenablement aménagés pour permettre l'insertion sélective d'un fluorophore sur l'amine en bout de chaîne. Notre choix s'est porté dans un premier temps sur le chromophore commercial 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD). Ainsi, le traitement de cette jaspine (**240**) avec du chlorure de 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBDCl) en présence de triéthylamine permet l'insertion du chromophore NBD en bout de chaîne et la déprotection simultanée du groupement Fmoc. La jaspine B protégée (**245**) est ensuite désilylée pour fournir la jaspine B-NBD (**246**) (cf. Schéma 50). Cette sonde s'est avérée fortement instable sous sa forme déprotégée, rendant son isolement et sa caractérisation difficiles.

Schéma 50 - Synthèse de la jaspine B-NBD (**246**)

Cependant, dans un deuxième temps, nous avons pu obtenir une nouvelle sonde fluorescente de la jaspine B par l'insertion d'une streptocyanine grâce à une collaboration interne avec C. Payraastre. Les cyanines représentent une classe de chromophore largement utilisée dans des technologies photoniques (sensibilisateur photographique, technologie laser, télécommunication,...) ainsi que pour des applications biologiques ou bio-médicales du fait de leurs propriétés photophysiques (autofluorescence limitée et absorption minimale du milieu vivant sur leur gamme spectrale).⁹¹ A titre d'exemple, une sonde sphingosine fluorescente dans la région du proche infra-rouge, marquée par une heptaméthine indocyanine, a été développée pour le suivi du métabolisme des SLs au niveau cellulaire.⁹²

Ainsi, l'analogue de la jaspine B (**240**) est mise en réaction avec le sel d'hémicarboxonium à chaîne pentacarbonée développée au sein du laboratoire par C. Payraastre pour former la streptocyanine (**247**) (cf. Schéma 51).⁹³ La déprotection successive du produit conjugué (**247**) permet alors d'accéder à la jaspine B-streptocyanine (**249**) avec un rendement global de 19% depuis (**240**).

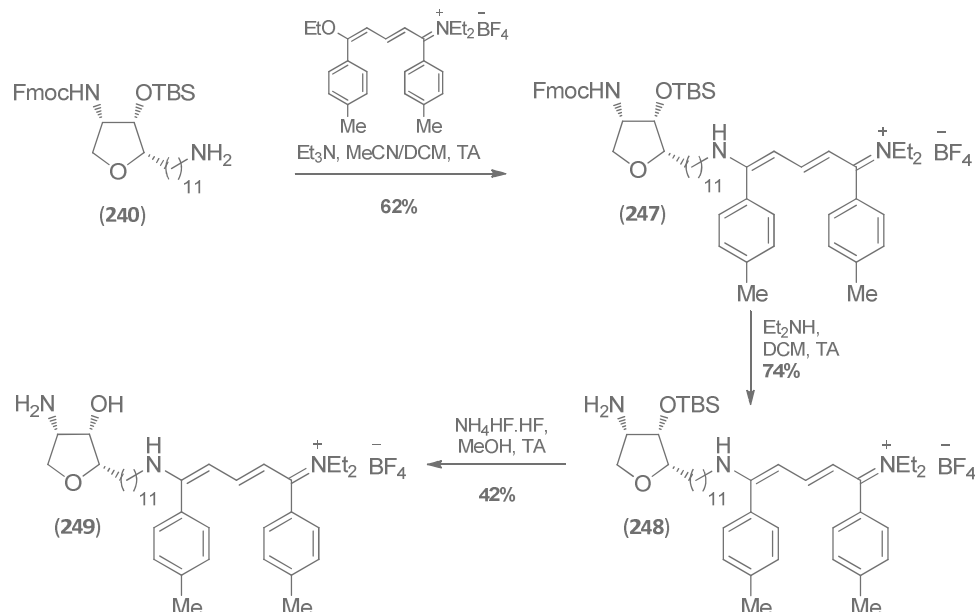


Schéma 51 - Synthèse de la jaspine B-streptocyanine (249)

Cette voie de synthèse nous a permis d'accéder à deux sondes de la jaspine B avec une chaîne undécacarbonée et un connecteur amine. La jaspine B-NBD (**246**) a été obtenu en 9 étapes avec un rendement global de 6% à partir de l'oxazolidinone lactone (**214**), et la jaspine B-streptocyanine (**249**) a été obtenue en 10 étapes avec un rendement global de 8% à partir de l'oxazolidinone lactone (**214**). Seule la jaspine B-streptocyanine (**249**) a présenté une stabilité suffisante pour être étudiée.

Cette voie pourra être utilisée par la suite pour développer des jaspines B ω -streptocyanine possédant des longueurs de chaînes alkyles introduites par le biais de différentes sulfones et des propriétés photophysiques adaptables par modulation de la longueur des chaînes polyméthine des streptocyanines.^{94, 95}

3) Imagerie de fluorescence

Les sondes jaspine B-BODIPY (**230**) et jaspine B-streptocyanine (**249**) synthétisées possèdent respectivement des longueurs d'ondes d'excitation de 496nm et 439nm, et des longueurs d'ondes d'émission de 508nm et 501nm. Ces propriétés sont donc compatibles avec de la microscopie de fluorescence dans des cellules, afin de suivre au niveau cellulaire la métabolisation de la jaspine B.

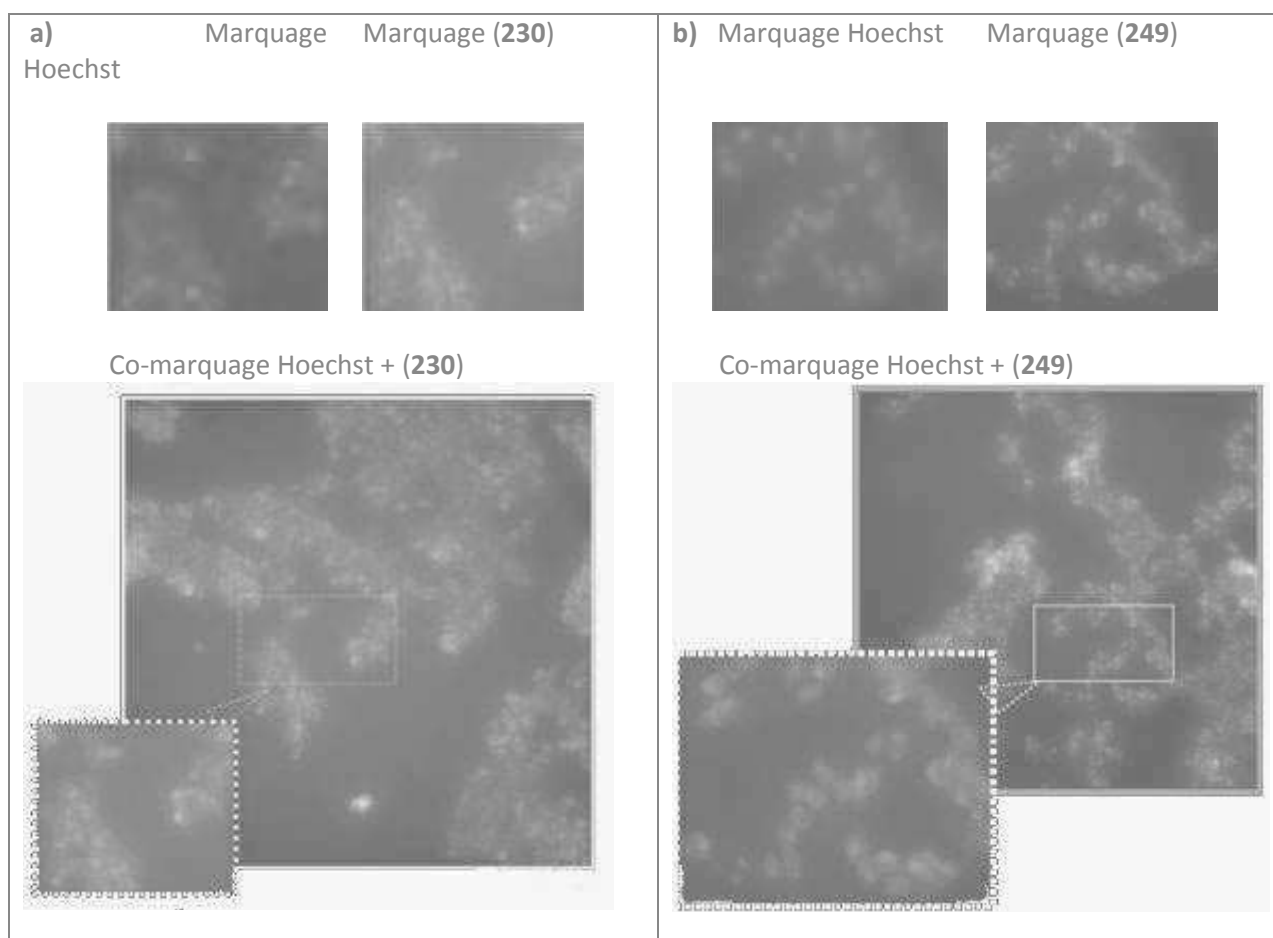


Figure 7 - a) image par microscopie de fluorescence de cellules HCT116 incubées avec la jaspine B-BODIPY (230)
b) image par microscopie de fluorescence de cellules HCT116 incubées avec la jaspine B-streptocyanine (249)

Des essais de microscopie de fluorescence ont ainsi été réalisés par le Dr. L. Fleury au sein de l'Unité de Service et de Recherche 3388-CNRS/Pierre Fabre-Pharmacochimie de la Régulation épigénétique du Cancer (ETAC) sur une lignée de cellules du cancer du côlon, HCT-116, sur laquelle la jaspine B possède une activité cytotoxique ($CI_{50} = 0.7\mu M$). Les cellules HCT-116 sont préincubées dans une microplaque de 96 puits avec un marqueur fluorescent et intercalant de l'ADN, Hoechst, colorant les noyaux des cellules en bleu, ainsi qu'avec l'une des sondes jaspine B. Les cellules sont ensuite lavées au PBS pour éliminer l'excédent en marqueurs, puis un milieu nutritif tamponné (milieu blanc HBSS tamponné+10% de SVF) est ajouté avant la lecture des plaques.

Ces essais préliminaires indiquent dans les deux cas l'internalisation de ces sondes dans la cellule. D'autre part, ces images mettent en évidence un marquage péri-nucléaire par ces sondes, en accord avec une interaction potentielle de la jaspine B avec la protéine CERT.

Des expériences de co-localisation des sondes avec des marqueurs du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi seront à réaliser par la suite afin d'approfondir la compréhension du mécanisme d'action de la jaspine B.

V. Conclusion

Ce travail visait à développer des sondes de la jaspine B afin d'étudier le mode d'action cellulaire de la jaspine B par microscopie de fluorescence.

Dans un premier temps, une nouvelle voie de synthèse de la jaspine B a été développée. Cette synthèse en série racémique à partir de la D-erythronolactone donne accès à l'intermédiaire oxazolidinone lactone (**214**), qui permet l'insertion de la chaîne aliphatique par oléfinatation de Julia modifiée. Le dédoublement du mélange racémique par HPLC chirale, puis les déprotections successives permettent d'accéder à la jaspine B et à son énantiomère avec un rendement global de 7%.

Cet intermédiaire oxazolidinone lactone a aussi été utilisé dans la synthèse des sondes fluorescentes de la jaspine B avec un connecteur ω -amine. Ainsi, une sonde jaspine B-NBD (**246**) et une sonde jaspine B-streptocyanine (**249**) ont été obtenues par cette voie.

L'utilisation de l'intermédiaire oxazolidinone vinylique (**210**) précédemment développé au laboratoire a permis d'accéder à une jaspine B-BODIPY (**230**) par une réaction de métathèse croisée.

Ces composés représentent les premiers et uniques exemples de sondes fluorescentes dérivant de la jaspine B.

Seules les jaspine B-BODIPY (**230**) et jaspine B-streptocyanine (**249**) ont montré une stabilité suffisante pour réaliser des expériences d'imagerie cellulaire par microscopie de fluorescence. Ces essais préliminaires ont mis en évidence une internalisation des sondes dans les cellules HCT116 et une localisation périnucléaire en accord avec une potentielle inhibition de la CERT.

Des expériences de co-localisation des sondes avec des marqueurs du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi seront à réaliser par la suite afin d'élucider le mécanisme d'inhibition de synthèse de SM par la jaspine B.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

The following solvents and reagents were dried prior to use. Dichloromethane (CH_2Cl_2), tetrahydrofuran (THF), acetonitrile (MeCN) were purified and dried with a system MB SPS 800 (MBRAUN). Dimethylformamide (DMF) (99.8% Acros Organics) and pyridine (99.5%, Acros Organics) were bought anhydrous. Benzene and toluene were freshly distilled from sodium/benzophenone, methanol (MeOH) was freshly distilled from magnesium/iodide and chloroform (CHCl_3) was freshly distilled from calcium hydride. Triethylamine (Et_3N) was distilled from calcium hydride and stored over potassium hydroxide pellets.

Thin layer chromatography (TLC) was performed using pre-coated TLC sheets Alugram Xtra SilG (Machery Nagel) and observed under UV light (254nm) and/or revealed with a 10% phosphomolybdic acid solution in ethanol. Products were purified by column chromatography with SDS 35-70 μm flash silica gel.

^1H and ^{13}C NMR spectrum were obtained with Bruker Advance 300MHz spectrometer. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) relative to residual deuterated solvent peak. For NMR spectrum description, following abbreviations are used: s (singlet), bs (broad singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet) and m (multiplet). Coupling constants are expressed in Hertz (Hz).

Mass spectrometry (MS) data were obtained on a ThermoQuest TSQ 7000 spectrometer and high resolution mass spectrometry data were performed on a Xevo G2 QTOF spectrometer.

Molecules are named according to the IUPAC nomenclature, but the numbering for NMR spectrum interpretation is made according to compound scheme for reasons of convenience.

General procedure for Julia Coupling

To a solution of lactone (1 eq) and sulfone (1.2 eq) in anhydrous THF (0.10M) under nitrogen at -78°C was added dropwise a 1.0M solution of LiHMDS in THF (2.4 eq) over 10 min. The reaction mixture was stirred at that temperature for 30 min and quenched by addition of acetic acid (3 eq). After hydrolysis, the mixture was extracted with EtOAc. The combined organic extracts were dried over magnesium sulfate and evaporated to dryness. The residue was dissolved in anhydrous THF (0.04M) and DBU (2 eq) was added. After 2 h stirring, the reaction mixture was evaporated to dryness and the resulting residue was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/ CH_2Cl_2 / PE 6: 24: 70) to give the desired compound as a mixture of *E* and *Z* isomers. In some cases, another compound deriving from the hydrolysis of the exo-double bond was observed.

General procedure for tetrahydrofuro[3,4]oxazolidinone reduction

A solution of alkene (1 eq) as a Z/E mixture and $(\text{PPh}_3)_3\text{RhCl}$ (0.2 eq) in benzene/ethanol (1:1, 0.075M) was stirred at 40°C for 14h under H_2 atmosphere. After evaporation to dryness, the residue was purified by flash chromatography on silica gel ($\text{EtOAc}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ / PE 6:24:70 to 10:40:50) to give the reduced product.

General procedure for oxazolidinone hydrolysis

KOH (10 eq) was added to a solution of oxazolidinone (1.0 eq) in $\text{EtOH}-\text{H}_2\text{O}$ (8:2) (0.05M). The mixture was heated at 85 °C for 7–18h (TLC monitoring) before being cooled to room temperature and diluted with EtOAc and brine. The mixture was extracted three times with EtOAc and the combined extracts were concentrated in vacuum.

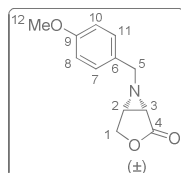
General method for oxidative cleavage of *p*-methoxybenzyl group

To a solution of *N*-PMB intermediate (1 eq) in $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ (9:1) (0.05M) was added CAN (6eq). The mixture was stirred at room temperature for 3 hours, then diluted with water and extracted with EtOAc . The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO_3 solution and brine, dried over magnesium sulfate and concentrated in vacuum.

General method for *O*-silylation

2,6-lutidine (3 eq) was added to a solution of alcohol (1 eq) in anhydrous CH_2Cl_2 (1mL) at 0°C under nitrogen. *Tert*-butyldimethylsilyltrifluoromethanesulfonate (1.7 eq) was added dropwise to reaction mixture at 0°C. The mixture was stirred overnight and allowed to warm to room temperature. Then the reaction mixture was diluted with EtOAc and washed with 1N HCl, water and brine. The organic layer was dried over sodium sulfate and evaporated to dryness.

6-(4-methoxybenzyl)-3-oxa-6-azabicyclo[3.1.0]hexan-2-one (213**)**



To a solution of D-erythroneolactone (**212**) (2.00g, 16.9mmol, 1 eq) in CH_2Cl_2 (80 ml) held at -78°C under argon were successively added pyridine (6.85ml, 84.7mmol, 5 eq) and a solution of trifluoromethanesulfonic anhydride (7.60ml, 45.7mmol, 2.7 eq) in CH_2Cl_2 (20 ml). After 15 min of stirring at -78°C, the reaction mixture was slowly warmed to -25°C over a period of 3.5 hours. The reaction solution was then poured into cold diethyl ether (200ml). The precipitate was filtered, and the filtrate was evaporated under reduced pressure at 0°C. The resulting residue was rapidly purified by filtration on silica gel (Et_2O) to afford the triflate (3.62g, 92%) as a yellow oil which was directly engaged in the next step. To a solution of triflate (3.62g, 15.6mmol) in DMF (70ml) at -30°C under argon was added dropwise *p*-methoxybenzylamine (3.06ml, 23.4mmol, 1.5 eq). The reaction mixture was stirred for 1h at -30°C before being diluted with ethyl acetate (60ml) and water (60ml). The layers were separated, and the aqueous phase was extracted with ethyl acetate (2 x 60ml). The combined organic extracts were dried over magnesium sulfate and evaporated to dryness. The resulting residue was purified by flash chromatography on silica gel ($\text{Et}_2\text{O}/\text{PE}$ 2:1) to give the *p*-methoxybenzylaziridine- γ -lactone (**213**) (1.53g, 45%) as an amorphous solid.

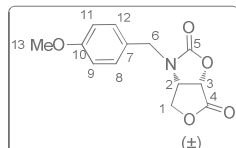
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.16 (m, 2H, H-7, 11); 6.81 (m, 2H, H-8, 10); 4.22 (d, 1H, H-1a, $J_{1a-1b}^2=9.9\text{Hz}$); 4.11 (dd, 1H, H-1b, $J_{1b-1a}^2=9.9\text{Hz}$, $J_{1b-2}^3=3.0\text{Hz}$); 3.73 (s, 3H, H-12); 3.57 (d, 1H, H-5a,

$J^2=13.2\text{Hz}$); 3.32 (d, 1H, H-5b, $J^2=13.2\text{Hz}$); 2.86 (dd, 1H, H-2, $J^3_{2-3}=4.5\text{Hz}$, $J^3_{2-1b}=3.0\text{Hz}$); 2.61 (d, 1H, H-3, $J^3_{3-2}=4.5\text{Hz}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 172.4 (C-4); 159.0 (C-9); 129.1 (C-7, 11); 129.0 (C-6); 113.9 (C-8, 10); 69.4 (C-1); 60.4 (C-5); 55.1 (C-12); 41.9 (C-2); 39.4 (C-3).

MS (Cl/NH_3): $m/z=237.4$ ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$). HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 220.0974; found: 220.0969

3-(4-methoxybenzyl)dihydrofuro[3,4-d]oxazole-2,6(3H,6aH)-dione (**214**)



To a solution of (**213**) (472mg, 2.16mmol, 1 eq) in CH_3CN (7mL) in a 10 ml glass pressure vial equipped with a stir bar was added methyl chloroformate (250 μL , 3.23mmol, 1.5 eq). The pressure vial was closed using a PTFE-silicon septum (vial and septum available from CEM Corporation). Then the reaction mixture was submitted to microwave irradiation (CEM DiscoverTM reactor, 160 W, 100 °C) for 2 hours. After cooling, the reaction mixture was evaporated to dryness. The resulting residue was purified by flash chromatography on silica gel ($\text{EtOAc}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 1:9) to give the oxazolidinone (**214**) (451mg, 79%) as a white amorphous solid.

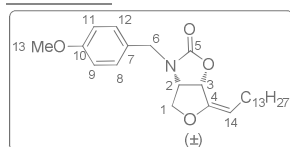
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.25-7.15 (m, 2H, H-8, 12); 7.00-6.90 (m, 2H, H-9, 11); 4.95 (d, 1H, H-3, $J^3=7.9\text{Hz}$); 4.67 (d, 1H, H-6a, $J^2=15.0\text{Hz}$); 4.35 (ddd, 1H, H-2, $J^3_{2-3}=7.9\text{Hz}$, $J^3_{2-1a}=4.1\text{Hz}$, $J^3_{2-1b}=1.5\text{Hz}$); 4.30 (AB of an ABX, 2H, H_{1a} and H_{1b} , $J^2_{1a-1b}=10.8\text{Hz}$, $J^3_{1a-2}=4.1\text{Hz}$, $J^3_{1b-2}=1.5\text{Hz}$); 4.29 (d, 1H, H-6b, $J^2=14.9\text{Hz}$); 3.81 (bs, 3H, H-14).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 170.4 (C-4); 159.9 (C-11); 155.9 (C-7); 129.8 (C-8, 12); 126.0 (C-10); 114.7 (C-9, 11); 69.8 (C-3); 68.5 (C-1); 55.4 (C-2); 55.2 (C-13); 46.8 (C-6).

HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 264.0872; found: 264.0863.

3-(4-methoxybenzyl)-6-tetradecylidenetetrahydrofuro[3,4-d]oxazol-2(3H)-one (**216**)

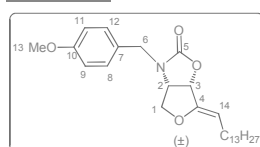
Prepared from lactone (**214**) (75mg, 0.29mmol) and 2-(tetradecylsulfonyl)benzo[d]thiazole (**215**) (135mg, 0.34mmol) according the general procedure for Julia Coupling to give compounds (**E-216**) and (**Z-216**) (70mg, 49%), ratio *E*: *Z* = 2:1.

E-isomer

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.25-7.15 (m, 2H, H-8, 12); 6.95-6.85 (m, 2H, H-9,11); 5.32 (dd, 1H, H-3, $J^3_{3-2}=7.9\text{Hz}$, $J^4_{3-14}=1.1\text{Hz}$); 5.13 (td, 1H, H-14, $J^3_{14-15}=8.1\text{Hz}$, $J^4_{14-3}=1.1\text{Hz}$); 4.67 (d, 1H, H-6a, $J^2=15.0\text{Hz}$); 4.18 (d, 1H, H-6b, $J^2=14.9\text{Hz}$); 4.16 (ddd, 1H, H-2, $J^3_{2-3}=7.9\text{Hz}$, $J^3_{2-1a}=4.4\text{Hz}$, $J^3_{2-1b}=1.4\text{Hz}$); 4.01 (dd, 1H, H-1b, $J^2_{1b-1a}=10.2\text{Hz}$, $J^3_{1b-2}=1.5\text{Hz}$); 3.80 (s, 3H, H-13); 3.71 (dd, 1H, H-1a, $J^2_{1b-1a}=10.2\text{Hz}$, $J^3_{1a-2}=4.7\text{Hz}$); 2.20-1.90 (m, 2H, H-15); 1.40-1.15 (m, 22H, H-16 to H-26), 0.98-0.84 (3H, m, H-27).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 159.6 (C-10); 157.2 (C-5); 152.0 (C-4); 129.6 (C-8,12); 127.1 (C-7); 114.4 (C-9,12); 106.8 (C-14); 73.2 (C-3); 70.6 (C-1); 58.2 (C-2); 55.3 (C-13); 46.6 (C-6); 32.0 (C-25), 30.2 (C-16), 29.7, 29.7, 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 26.7 (C-17 to C-24); 22.7 (C-15, 26); 14.2 (C-27).

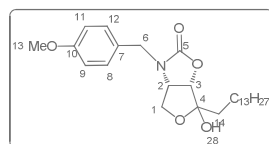
MS (Cl/NH_3): $m/z=461.3$ ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$), HRMS m/z calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 443.3114; found: 444.3125.

Z-isomer

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.25-7.15 (m, 2H, H-8, 12); 6.95-6.85 (m, 2H, H-9,11); 5.12 (d, 1H, H-3, $J^3_{3-2}=7.9\text{Hz}$); 4.80 (t, 1H, H-14, $J^3_{14-15}=7.4\text{Hz}$); 4.68 (d, 1H, H-6a, $J^2=15.0\text{Hz}$); 4.16 (d, 1H, H-6b, $J^2=14.9\text{Hz}$); 4.14 (ddd, 1H, H-2, $J^3_{2-3}=7.7\text{Hz}$, $J^3_{2-1a}=4.9\text{Hz}$, $J^3_{2-1b}=1.6\text{Hz}$); 4.08 (dd, 1H, H-1b, $J^2_{1b-1a}=10.2\text{Hz}$, $J^3_{1b-2}=1.6\text{Hz}$); 3.81 (s, 3H, H-13); 3.80 (dd, 1H, H-1a, $J^2_{1b-1a}=10.1\text{Hz}$, $J^3_{1a-2}=4.8\text{Hz}$); 2.08 (q, 2H, H-15, $J=7.2\text{Hz}$); 1.40-1.15 (m, 22H, H-16 to H-26), 0.98-0.84 (3H, m, H-27).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 159.6 (C-10); 157.2 (C-5); 151.7 (C-4); 129.7 (C-8,12); 127.1 (C-7); 114.4 (C-9,11); 107.0 (C-5); 75.7 (C-3); 71.3 (C-1); 57.8 (C-2); 55.3 (C-13); 46.5 (C-6); 32.0 (C-25); 29.7, 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.4, 29.3, 25.4 (C-15 to C-24); 22.7 (C-26); 14.2 (C-27).

MS (Cl/NH_3): $m/z=461.3$ ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$), HRMS m/z calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 443.3114; found: 444.3136.

6-hydroxy-3-(4-methoxybenzyl)-6-tetradecyltetrahydrofuro[3,4-d]oxazol-2(3H)-one (217)

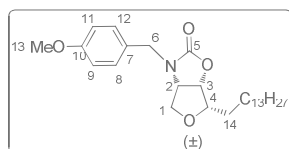
Compound **(217)** (10mg, 8%) resulting from the hydration of the exo-double bond.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.25-7.15 (m, 2H, H-8,12); 6.90-6.80 (m, 2H, H-9,11); 4.68 (d, 1H, H-6a, $J^2=15.0\text{Hz}$); 4.59 (d, 1H, H-3, $J^3_{3-2}=7.5\text{Hz}$); 4.14 (ddd, 1H, H-2, $J^3_{2-3}=7.5\text{Hz}$, $J^3_{2-1a}=3.4\text{Hz}$, $J^3_{2-1b}=1.6\text{Hz}$); 4.08 (d, 1H, H-6b, $J^2=15.0\text{Hz}$); 3.90-3.80 (m, 2H, H-1); 3.79 (s, 3H, H-13); 2.70-2.20 (bs, 1H, H-28); 1.96-1.82 (m, 1H, H-14a); 1.81-1.68 (m, 1H, H-14b); 1.55-1.40 (m, 2H, H-15); 1.35-1.15 (m, 22H, H-16 to H-26); 0.92-0.82 (3H, m, H-27).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 159.6 (C-10); 157.0 (C-5); 129.6 (C-8,12); 127.2 (C-7); 114.4 (C-9,11); 107.4 (C-4); 80.6 (C-3); 67.6 (C-1); 59.0 (C-2); 55.3 (C-13); 46.3 (C-6); 34.9 (C-14); 31.9 (C-25), 29.8, 29.7, 29.7, 29.7, 29.7, 29.7, 29.6, 29.6, 29.4, 23.3 (C-15 to C-24); 22.7 (C-26); 14.2 (C-27).

MS (Cl/NH_3): $m/z=479.4$ ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$), HRMS m/z calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 462.3219; found: 462.3227.

3-(4-methoxybenzyl)-6-tetradecyltetrahydrofuro[3,4-*d*]oxazol-2(3*H*)-one (**218**)



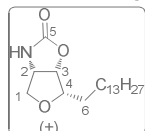
Prepared from (**216**) (89mg, 0.20mmol) according to general procedure for tetrahydrofuro[3,4]oxazolidinone reduction to give compound (**218**) (70mg, 78%).

^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.25-7.15 (m, 2H, H-8,12); 6.90-6.80 (m, 2H, H-9,11); 4.76 (dd, 1H, H-3, $J^3_{3-2}=7.6\text{Hz}$, $J^3_{3-4}=3.7\text{Hz}$); 4.71 (d, 1H, H-6a, $J^2=14.9\text{Hz}$); 4.08 (d, 1H, H-6b, $J^2=15.0\text{Hz}$); 4.07 (dd, 1H, H-2, $J^3_{2-3}=7.6\text{Hz}$, $J^3_{2-1b}=3.8\text{Hz}$); 3.94 (d, 1H, H-1a, $J^2_{1a-1b}=10.6\text{Hz}$); 3.80 (s, 3H, H-13); 3.49 (td, 1H, H-4, $J^3_{4-14}=6.8\text{Hz}$, $J^3_{4-3}=3.8\text{Hz}$); 3.30 (dd, 1H, H-1b, $J^2_{1a-1b}=10.6\text{Hz}$, $J^3_{1b-2}=4.0\text{Hz}$); 1.84-1.68 (m, 2H, H-14), 1.50-1.16 (m, 24H, H-15 to H-26); 0.92-0.82 (3H, m, H-27).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 159.4 (C-10); 157.6 (C-5); 129.6 (C-8,12); 127.4 (C-7); 114.3 (C-9,11); 83.5 (C-4); 77.7 (C-3); 69.3 (C-1); 60.0 (C-2); 55.3 (C-13); 46.2 (C-6); 31.9, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 28.0, 26.0, 22.7 (C-14 to C-26); 14.1 (C-27).

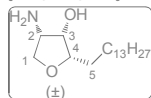
HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 446.3270; found: 446.3266.

6-tetradecyltetrahydrofuro[3,4-*d*]oxazol-2(3*H*)-one (**219**)



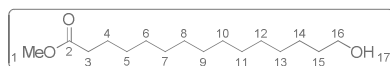
Prepared from (**218**) (70mg, 0.157mmol) according to the general procedure for oxidative cleavage of *N*-PMB. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel ($\text{EtOAc}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 40:60) to give (**219**) (37mg, 72%). All analyses were in agreement with data reported in the literature.⁶⁴

(2*S*,3*S*,4*S*)-4-amino-2-tetradecyltetrahydrofuran-3-ol or jaspine B (**2**)



Prepared from (**219**) (20mg, 0.062mmol) according to the general procedure for oxazolidinone hydrolysis. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel ($\text{EtOAc}/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ 84.2:15:0.8) to give racemic jaspine B (**2**) (15.6mg, 85%). All analyses were in agreement with data reported in the literature.⁶⁴

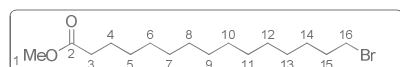
Methyl-15-hydroxypentadecanoate (**220**)



Sulfuric acid (80 μ L, 1.50mmol, 0.2 eq) was added to a solution of ω -pentadecalactone (2.0g, 7.90mmol, 1 eq) in methanol (12mL). The mixture was stirred at room temperature for 18h, and then concentrated until dryness. The residue was dissolved in EtOAc and washed with water until neutral pH of the aqueous phase. Then, the organic layer was dried over sodium sulfate and evaporated to dryness, to afford a pure white solid (2.1g, quantitative yield). This compound showed identical spectroscopic data to those reported in the literature.⁸⁴

¹H-NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ (ppm): 3.62 (s, 3H, H-1); 3.55 (t, 2H, H-16, $J^3_{16-15}=6.6\text{Hz}$); 2.27 (t, 2H, H-3, $J^3_{3-4}=7.2\text{Hz}$); 1.65-1.43 (m, 4H, H-4,15); 1.40-1.13 (m, 20H, H-5 to H-14).

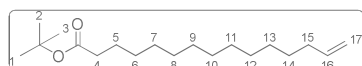
Methyl-15-bromopentadecanoate (221)



To a solution of **(220)** (2.18g, 8.02mmol, 1 eq) and triphenylphosphine (8.37g, 31.80mmol, 4 eq) in DMF (32mL) was added *N*-bromosuccinimide (6.57g, 36.94mmol, 4.6 eq) in portions. The reaction was stirred at 60°C for 1 hour. Methanol (20mL) was added followed by 1N HCl (300mL). The mixture was extracted with EtOAc and the combined organic extracts were washed with brine, dried over sodium sulfate and evaporated to dryness to give brown oil. The residue was dissolved in EtOAc (15mL) and PE was added, leaving behind after filtration Ph₃P=O. After evaporation of the solvent under vacuum, the residue was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/ PE 5:95) to give the compound **(221)** as a white solid (2.05g, 76%). This compound showed identical spectroscopic data to those reported in literature.⁸⁴

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 3.62 (s, 3H, H-1); 3.36 (t, 2H, H-16, $J^3_{16-15}=6.9\text{Hz}$); 2.27 (t, 2H, H-3, $J^3_{3-4}=7.5\text{Hz}$); 1.89-1.75 (m, 2H, H-15); 1.67-1.51 (m, 2H, H-4); 1.47-1.36 (m, 2H, H-14); 1.34-1.22 (m, 18H, H-5 to H-13).

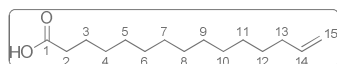
tert-butylpentadec-14-enoate (222)



A 1.7M solution of *t*-BuOK in THF (16.7mL, 28.47mmol, 4.7 eq) was added on **(221)** (2.029g, 6.06mmol, 1 eq). The mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction was quenched with a 1N solution of HCl (100mL). The mixture was extracted with EtOAc and the combined organic extracts were washed with brine, dried over magnesium sulfate and evaporated to dryness. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/ PE 1:99 to 10:90) to give the compound **(222)** as yellow oil (826mg, 46%). This compound showed identical spectroscopic data to those reported in the literature.⁸⁴

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 5.80 (ddt, 1H, H-16, $J^3_{16-17a}=17.1\text{Hz}$, $J^3_{16-17b}=10.5\text{Hz}$, $J^3_{16-15}=6.6\text{Hz}$); 4.97 (dd, 1H, H-17a, $J^3_{17a-16}=17.2\text{Hz}$, $J^3_{17a-17b}=3.6\text{Hz}$); 4.90 (dd, 1H, H-17b, $J^3_{17b-16}=10.2\text{Hz}$, $J^3_{17b-17a}=2.2\text{Hz}$); 2.18 (t, 2H, H-4, $J^3_{4-5}=7.5\text{Hz}$); 2.08-1.96 (m, 2H, H-15); 1.66-1.50 (m, 2H, H-5); 1.43 (s, 9H, H-1,2,3); 1.37-1.22 (m, 18H, H-6 to H-14).

Pentadec-14-enoic acid (223)

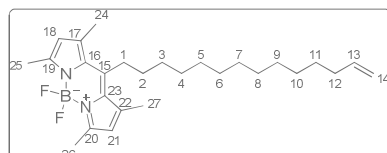


To a solution of **(222)** (800 mg, 2.70 mmol, 1 eq) in anhydrous CH_2Cl_2 (82 mL) at room temperature under nitrogen was added TFA (16.5mL, 216mmol, 80 eq). The mixture was stirred for 24 hours. After evaporation of the solvent under vacuum, the residue was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/ PE 95:5 to 90:10) to give the compound **(223)** as a white solid (332mg, 51%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 5.79 (ddt, 1H, H-14, $J^3_{14-15a}=17.1\text{Hz}$, $J^3_{14-15b}=10.5\text{Hz}$, $J^3_{14-13}=6.6\text{Hz}$); 4.96 (dd, 1H, H-15a, $J^3_{15a-14}=17.2\text{Hz}$, $J^3_{15a-15b}=3.6\text{Hz}$); 4.89 (dd, 1H, H-15b, $J^3_{15b-14}=10.2\text{Hz}$, $J^3_{15b-15a}=2.2\text{Hz}$); 2.36 (t, 2H, H-2, $J^3_{2-3}=7.5\text{Hz}$); 2.08-2.00 (m, 2H, H-13); 1.67-1.48 (m, 2H, H-3); 1.44-1.10 (m, 18H, H-4 to H-12).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 170.0 (C-1); 139.1 (C-14); 114.1 (C-15); 42.7 (C-2); 33.7 (C-13), 29.6, 29.5, 29.4, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 28.9, 23.8 (C-3 to C-12).

4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-8-(tetradec-13-enyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (**224**)

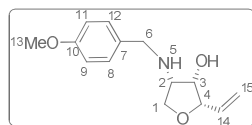


To a solution of **(223)** (100mg, 0.417mmol, 1 eq) in dry CH_2Cl_2 (8mL) at 0°C under nitrogen was added dry DMF (3 μL , 0.039mmol, 0.1 eq). Then oxalyl chloride (47 μL , 0.542mmol, 1.3 eq) was added carefully and the mixture was allowed to reach room temperature. The reaction mixture was stirred for 3 hours until gas evolution ceased and solvents were evaporated to dryness. The residue was dissolved in dry CH_2Cl_2 (8mL) and 2,4-dimethylpyrrole (0.108mL, 1.045mmol, 2.5 eq) and phosphorus oxychloride (42 μL , 0.4583mmol, 1.1 eq) were added. The solution was heated to reflux and stirred overnight. Then, the mixture was concentrated to dryness. The residue was treated with *n*-pentane and stored overnight at -20°C . The supernatant was removed and the residue was dissolved in dry toluene (3mL) and heated at 80°C . Then, a solution of DBU in THF (1M, 1.25mL, 1.2496mmol, 3 eq) was added and the mixture was stirred at 80°C for 70 minutes. Boron trifluoride diethyletherate (0.27mL, 2.083mmol, 5 eq) was added and the solution was stirred for additional 1 hour. After cooling to room temperature, the reaction was quenched by the addition of water and CH_2Cl_2 . The organic layer was washed with brine, dried over magnesium sulfate and evaporated to dryness. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/ PE 3:97) to give the compound **(224)** as red solid (22mg, 12%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 6.06 (s, 2H, H-18,21); 5.82 (ddt, 1H, H-13, $J^3_{14-15a}=17.1\text{Hz}$, $J^3_{14-15b}=10.5\text{Hz}$, $J^3_{14-13}=6.6\text{Hz}$); 5.02 (dd, 1H, H-15a, $J^3_{15a-14}=17.2\text{Hz}$, $J^3_{15a-15b}=3.6\text{Hz}$); 4.93 (dd, 1H, H-15b, $J^3_{15b-14}=10.2\text{Hz}$, $J^3_{15b-15a}=2.2\text{Hz}$); 3.00-2.90 (m, 2H, H-12); 2.51 (s, 6H, H-25,26); 2.41 (s, 6H, H-24,27); 2.03 (m, 2H, H-1); 1.55 (m, 2H, H-2); 1.37-1.17 (m, 18H, H-3 to H-11).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 153.7, 146.7, 140.3, 131.4 (C-15,16,17,19,20,22,23); 139.3 (C-13); 121.5 (C-18,21); 114.1 (C-14); 33.8, 31.9, 30.4, 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.1, 28.9, 28.5 (C-1 to C-12); 16.4, 14.4 (C-24,25,26,27).

HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{F}_2\text{B}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 444.3409; found: 443.3396; calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{FB}$ $[\text{M}-\text{F}]^+$: 422.3383; found: 422.3372.

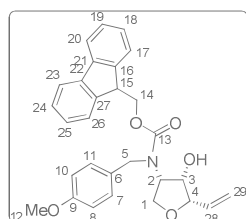
(2S,3S,4S)-4-(4-methoxybenzylamino)-2-vinyltetrahydrofuran-3-ol (225)

Prepared from (3a*S*,6*S*,6a*S*)-3-(4-methoxybenzyl)-6-vinyltetrahydrofuro[3,4-*d*]oxazol-2(3*H*)-one **2 (210)**⁶⁴ (34mg, 0.124mmol, 1 eq) according to general procedure for oxazolidinone hydrolysis. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/ PE 60:40 to 100:0) to give **(225)** as a colorless oil (25mg, 81%).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7.22 (d, 2H, H-8,12, $J^3=8.7\text{Hz}$); 6.85 (d, 2H, H-9,11, $J^3=8.7\text{Hz}$); 6.00 (ddd, 1H, H-14, $J^3_{14-15a}=16.8\text{Hz}$, $J^3_{14-15b}=10.5\text{Hz}$, $J^3_{14-3}=6.3\text{Hz}$); 5.35 (dt, 1H, H-15a, $J^3_{15a-14}=16.8\text{Hz}$, $J^2_{15a-15b}=1.5\text{Hz}$); 5.26 (dt, 1H, H-15b, $J^3_{15b-14}=10.5\text{Hz}$, $J^2_{15b-15a}=1.5\text{Hz}$); 4.31-4.24 (m, 1H, H-4); 4.00-3.93 (m, 2H, H-1a,3); 3.78 (s, 3H, H-13); 3.76-3.72 (m, 2H, H-6); 3.61 (t, 1H, H-2, $J^3=8.1\text{Hz}$); 3.43 (td, 1H, H-1b, $J^3=7.8\text{Hz}$, $J^2=3.0\text{Hz}$); 3.00 (bs, 1H, H-5).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 158.9 (C-10); 134.0 (C-14); 131.0 (C-7); 129.3 (C-8,12); 117.7 (C-15); 113.9 (C-9,11); 83.7 (C-4); 70.7 (C-1); 70.3 (C-3); 61.0 (C-2); 55.1 (C-13); 51.8 (C-6).

HRMS m/z : calcd for C₁₄H₂₀NO₃ [M+H]⁺: 250.1443; found: 250.1445.

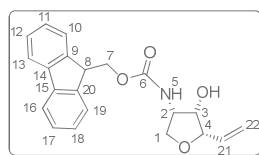
(9H-fluoren-9-yl)methyl-(3*S*,4*S*,5*S*)-4-hydroxy-5-vinyltetrahydrofuran-3-yl-(4-methoxybenzyl) carbamate (226)

To a solution of aminoalcohol **(225)** (25mg, 0.100mmol, 1 eq) in THF (1.24mL) and saturated aqueous Na₂CO₃ (0.50mL) was added Fmoc-Cl (31mg, 0.121mmol, 1.2 eq) at 0°C. The reaction mixture was stirred at the same temperature for 3h. Then, the reaction was quenched with a saturated solution of NH₄Cl. The mixture was extracted with EtOAc and the combined organic extracts were dried over magnesium sulfate and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/ PE 30:70) to give the compound **(226)** as a white oil (36mg, 77%).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7.66-7.62 (3, 2H, H-20,23); 7.40-7.15 (m, 6H, H-17,18,19,24,25,26); 6.92-6.85 (d, 2H, H-7,11); 6.77-6.69 (d, 2H, H-8,10); 5.92-5.74 (m, 1H, H-28); 5.35-5.20 (m, 2H, H-29); 4.64-4.43 (m, 3H, H-5a,14); 4.30-3.80 (m, 6H, H-5b, 15, 4, 3, 2, 1-a); 3.71 (s, 3H, H-12); 3.59 (m, 1H, H-1b).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 158.7 (C-9); 157.3 (C-13); 143.7 (C-16,27); 141.3 (C-21,22); 133.0 (C-28); 127.7, 127.6, 127.1, 124.7, 119.9, 114.0 (C-7,11,19,24,20,23,18,25,17,26,8,10); 118.5 (C-29); 82.8 (C-4); 73.4 (C-3); 67.3 (C-1); 66.1 (C-14); 60.4 (C-2); 55.2 (C-12); 47.3 (C-15); 40.8 (C-5).

HRMS m/z : calcd for C₂₉H₃₀NO₅ [M+H]⁺: 472.2124; found: 472.2119.

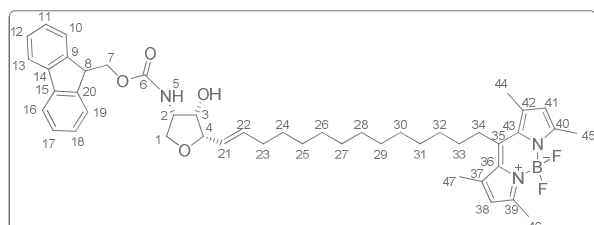
(9H-fluoren-9-yl)methyl-(3S,4S,5S)-4-hydroxy-5-vinyltetrahydrofuran-3-ylcarbamate (227**)**

To a solution of (**226**) (36mg, 0.076mmol, 1 eq) in anhydrous CH_2Cl_2 (4.04mL) at 0°C under nitrogen was added TFA (0.83mL, 10.85mmol, 140 eq). The mixture was stirred overnight and allowed to warm to room temperature. After evaporation of the solvent under vacuum, the residue was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/ PE 30:70 to 40:60) to give the compound (**227**) as a white solid (19mg, 71%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.78-7.75 (m, 2H, H-13,16); 7.60-7.58 (m, 2H, H-10,19); 7.43-7.29 (m, 4H, H-11,12,17,18); 6.00-5.80 (m, 1H, H-21); 5.56-5.34 (m, 2H, H-22); 4.48-4.40 (m, 4H, H-7,8,4); 4.22 (t, 1H, H-3, $J^3_{3-4} = J^3_{3-2} = 7.2\text{Hz}$); 4.20-4.12 (m, 1H, H-2); 4.12-4.05 (m, 1H, H-1a); 3.73-3.60 (m, 1H, H-1b).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 143.8 (C-9,20); 141.3 (C-14,15); 132.6 (C-21); 127.7 (C-12,17); 127.1 (C-13,16); 125.0 (C-11,18); 119.9 (C-10,19); 119.2 (C-22); 82.3 (C-4); 71.7 (C-3); 70.3 (C-1); 66.9 (C-7); 54.6 (C-2); 47.2 (C-8).

HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{NO}_4\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 374.1368; found: 374.1362.

10-(14-((2S,3S,4S)-4-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)tetradec-13-enyl)- 5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5H-dipyrrolo[1,2-c:1',2'-f][1,3,2]diazaborinin-4-ium-5-uide (228**)**

To a solution of (**227**) (5.6mg, 0.0159mmol, 1 eq) and (**224**) (14.1mg, 0.0319mmol, 2 eq) in degassed anhydrous CH_2Cl_2 (0.15mL) under nitrogen was added Grubbs-Hoveyda II catalyst (1.0mg, 0.0016mmol, 0.1 eq). The reaction mixture was heated to reflux with stirring under nitrogen for 4 hours. After cooling, the mixture was concentrated to dryness. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/ PE 30:70) to give the compound (**228**) as an orange oil (8mg, 67%).

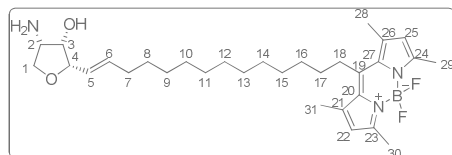
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.78-7.75 (m, 2H, H-13,16); 7.60-7.58 (m, 2H, H-10,19); 7.43-7.29 (m, 4H, H-11,12,17,18); 6.99 (s, 1H, H-5); 6.05 (s, 2H, H-36,41); 6.0-5.80 (m, 1H, H-21); 5.58-5.35 (m, 1H, H-22); 4.48-4.40 (m, 3H, H-7,8); 4.27-4.19 (m, 1H, H-4); 4.16-4.04 (m, 3H, H-1a,2,3); 3.70-3.60 (m, 1H, H-1b); 3.00-2.85 (m, 2H, H-23); 2.51 (s, 6H, H-45,46); 2.41 (s, 6H, H-44,47); 2.17-2.00 (m, 2H, H-34); 1.58-1.17 (m, 20H, H-24 to H-33).

$^{11}\text{B-NMR}$ (CDCl_3 , 96 MHz) δ (ppm): 0.591 (t, $J_{\text{B-F}} = 33\text{Hz}$)

$^{19}\text{F-NMR}$ (CDCl_3 , 282 MHz) δ (ppm): -146.6 (q, $J_{\text{B-F}} = 33\text{Hz}$)

HRMS m/z : calcd for $C_{46}H_{58}N_3O_4F$ $[M-F]^+$: 745.4541; found: 745.4551; calcd for $C_{46}H_{58}N_3O_4F_2BNa$ $[M+Na]^+$: 787.4422; found: 787.4435.

10-(14-((2S,3S,4S)-4-amino-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)tetradec-13-enyl)-5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5H-dipyrrolo[1,2-c:1',2'-f][1,3,2]diazaborinin-4-ium-5-uide (229)



To a solution of **(228)** (5mg, 0.0065mmol, 1 eq) in CH_2Cl_2 (0.50mL) under nitrogen was added NH_4Et_2 (67 μ L, 100 eq). The mixture was stirred for 8 hours in dark at room temperature. After evaporation of the solvent under vacuum, the residue was purified by flash chromatography on silica gel (CH_2Cl_2 / MeOH 95:5) to give the compound **(229)** as an orange oil (6mg, 90%).

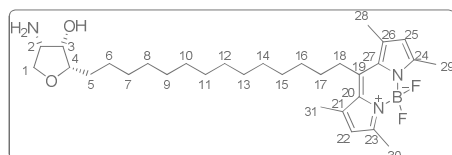
1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ (ppm): 5.98 (s, 2H, H-22,25); 5.95-5.75 (m, 1H, H-5); 5.75-5.50 (m, 1H, H-6); 4.30-4.18 (m, 2H, H-4,1a); 4.02-3.98 (m, 1H, H-3); 3.88-3.72 (m, 1H, H-1b); 3.70-3.58 (m, 1H, H-2); 2.95-2.80 (m, 2H, H-7); 2.44 (s, 6H, H-29,30); 2.34 (s, 6H, H-28,31); 2.05-1.90 (m, 2H, H-18); 1.36-1.15 (m, 20H, H-8 to H-17).

^{11}B -NMR ($CDCl_3$, 96 MHz) δ (ppm): 0.589 (t, J_{B-F} =33Hz)

^{19}F -NMR ($CDCl_3$, 282 MHz) δ (ppm): -146.6 (q, J_{B-F} =33Hz)

MS (ESI) m/z =556.4 $[M-F+OMe+H]^+$; 536.4 $[M-2F+OMe]^+$.

10-(14-((2S,3S,4S)-4-amino-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)tetradecyl)-5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5H-dipyrrolo[1,2-c:1',2'-f][1,3,2]diazaborinin-4-ium-5-uide (230)



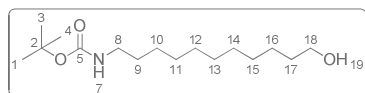
(PPh_3) $_3RhCl$ (5mg, 0.0055mmol, 0.5 eq) was added to a solution of **(229)** (6mg, 0.0110mmol, 1 eq) in absolute ethanol (2mL). The mixture was stirred at room temperature in dark for 48 hours under H_2 atmosphere. After evaporation to dryness, the residue was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc) to give **(230)** as an orange solid (1.4mg, 23%).

LC/MS: column acquity BEH C18 1.7 μ m 21*50mm, elution with $HCOOH$ 0.1%/MeOH $HCOOH$ 0.1% (45:55), flow 0.6mL/min, detection scan UV and scan ES+, m/z =558.0 $[M-F+OMe+H]^+$; 579.9 $[M-F+OMe+Na]^+$, purity = 100%.

UV (EtOH): λ_{max} = 496 nm, ϵ = 4286 L.mol $^{-1}$.cm $^{-1}$

Fluorescence (EtOH): λ_{ex} = 496 nm, λ_{em} = 508 nm.

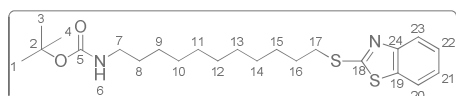
tert-butyl-11-hydroxyundecylcarbamate (233)



To a solution of 11-bromoundecan-1-ol (10.1g, 40.4mmol, 1 eq) in DMF (100mL) was added potassium phthalimide (8.24g, 44.5mmol, 1.1 eq) under nitrogen. The reaction mixture was stirred for 5 h at 80°C. After cooling to room temperature, the mixture was diluted with CH₂Cl₂ and filtrated on celite. Solvent was evaporated and the residue was dissolved in CH₂Cl₂, washed with water and saturated NaCl, extracted with EtOAc. The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and evaporated to dryness. The phthalimide (**232**) obtained as a white solid (12.1g) was solubilized with hot ethanol (150mL). Monohydrate hydrazine (9.24mL, 190.6mmol, 5eq.) was added and the mixture was refluxed for 40min, filtrated and concentrated to dryness. The solid was then dissolved in MeOH, and di-*tert*-butyl dicarbonate (9.03g, 41.4mmol, 1eq) and NaOH (1.63g, 40.4mmol, 1 eq) were added. The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 18h and concentrated to dryness. The residue was dissolved in CH₂Cl₂, washed with water and dried over sodium sulfate and evaporated to dryness. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (EP/ EtOAc 80:20 to 0:100) to give the compound (**233**) (6.87g, 59%). This compound showed spectroscopic data in agreement with the data reported in the literature.⁸⁵

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 3.64 (t, 2H, H-18, $J^3_{18-17}=9\text{Hz}$), 3.10 (t, 2H, H-8, $J^3_{8-9}=9\text{Hz}$), 1.60-1.53 (m, 4H, H-9, 17), 1.45 (s, 9H, H-1,3,4), 1.39-1.24 (m, 14H, H-10 to 16).

tert-butyl-11-(benzo[d]thiazol-2-ylthio)undecylcarbamate (**234**)

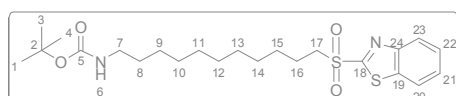


Diisopropyl azodicarboxylate (3.75mL, 19.1mmol, 1.05 eq) in dry THF (6mL) was added to a stirred solution of (**233**) (5.21g, 18.15mmol, 1 eq), triphenylphosphine (5.10g, 19.40mmol, 1.07eq.) and 2-mercaptobenothiazole (3.19g, 19.05mmol, 1.05 eq) in dry THF (25mL) at 5°C under nitrogen. The mixture was allowed to reach room temperature, stirred for 24h, and then the solvent was removed by evaporation. The residue was dissolved in EtOAc (60mL) and PE (60mL), stirred for 2h, filtrated through Celite and evaporated to give yellow oil (14.4g). This crude product was purified by flash chromatography on silica gel (EP/ EtOAc 98:2 to 94:6) to give (**234**) as a white solid (6.72g, 85%).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7.89 (d, 1H, H-23, $J^3=8.1\text{Hz}$); 7.74 (d, 1H, H-20, $J^3=7.8\text{Hz}$); 7.45-7.27 (m, 2H, H-21,22); 4.49 (bs, 1H, H-6); 3.36 (t, 2H, H-17, $J^3=7.2\text{Hz}$); 3.15-3.05 (m, 2H, H-7); 1.90-1.75 (m, 2H, H-16); 1.55-1.40 (m, 11H, H-1,3,4,8); 1.40-1.20(m, 14H,H-9 to 15).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 126.1, 124.3, 121.3, 120.9 (C-20 to 23); 33.8, 30.1, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 29.0, 28.7, 26.8 (C-7 to C17); 28.4 (C-1,3,4).

tert-butyl-11-(benzo[d]thiazol-2-ylsulfonyl)undecylcarbamate (**231**)



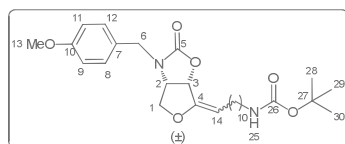
m-Chloroperbenzoic acid (70%, 18.6g, 75.4mmol, 5 eq) in CH₂Cl₂ (80mL) was added to a stirred solution of (**234**) (6.5g, 15.1mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (100mL) at 0°C. Floating water was removed. The mixture was allowed to reach room temperature and stirred

for 14h. Then, the reaction was quenched with Na₂S₂O₃ saturated aqueous solution. The mixture was extracted with diethyl ether and the combined organic extracts were washed with saturated NaHCO₃, water and brine. Then, the organic layer was dried over sodium sulfate and evaporated to dryness, to afford a white solid (7.6g). The crude solid was purified by flash chromatography on silica gel (PE/EtOAc 95:5 to 0:100) to give compound **(231)** as a white solid (6.6g, 94%).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 8.22 (d, 1H, H-23, J³=7.5Hz); 8.07-8.00 (m, 1H, H-20); 7.67-7.57 (m, 2H, H-21,22); 4.51 (bs, 1H, H-6); 3.55-3.45 (m, 2H, H-17); 3.09 (t, 2H, H-7, J³₇₋₈=7.2Hz); 1.95-1.80 (m, 2H, H-16); 1.55-1.35 (bs, 11H, H-1,3,4,8); 1.5-1.20 (bs, 14H, H-9 to 15).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 127.9, 127.6, 125.4, 122.3 (C-20 to 23); 54.7 (C-17); 30.0, 29.4, 29.3, 29.1, 28.8, 26.7, 22.2 (C-7 to 16); 28.4 (C-1,3,4).

tert-butyl-11-(3-(4-methoxybenzyl)-2-oxotetrahydrofuro[3,4-d]oxazol-6(6aH)-ylidene)undecyl)carbamate (235)

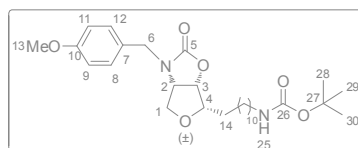


Prepared from lactone **(214)** (536mg, 2.04mmol, 1 eq) and sulfone **(231)** (1.15g, 2.45mmol, 1.2 eq) according to the general procedure for Julia Coupling. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/CH₂Cl₂/EP 6:24:70 to 10:40:50) to give compound **(235)** (920mg, 87%) as a mixture of *E* and *Z* isomers (ratio *E*: *Z* = 7:3).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7.25-7.15 (m, 2H, H-8,12); 6.95-6.85 (m, 2H, H-9,11); 5.32 (dd, 0.7H, H-3-*E*, J³₃₋₂=7.9Hz, J³₃₋₁₄=1.0Hz); 5.12 (d, 0.3H, H-3-*Z*, J³₃₋₂=7.9Hz); 5.10 (d, 0.7H, H-14-*E*, J³₁₄₋₁₅=8.0Hz); 4.80 (t, 0.3H, H-14-*Z*, J³₁₄₋₁₅=7.5Hz); 4.67 (d, 0.3H, H-6a-*Z*, J²=15.0Hz); 4.66 (d, 0.7H, H-6a-*E*, J²=15.0Hz); 4.60-4.40 (bs, 1H, H-25); 4.25-4.10 (m, 2H, H-2, 6b); 4.08 (dd, 0.3H, H-1b-*Z*, J²_{1b-1a}=10.2Hz, J³_{1b-2}=1.6Hz); 4.01 (dd, 0.7H, H-1b-*E*, J²_{1b-1a}=10.1Hz, J³_{1b-2}=1.3Hz); 3.80 (s, 3H, H-13); 3.79 (dd, 0.3H, H-1a-*Z*, J²_{1b-1a}=10.1Hz, J³_{1a-2}=4.9Hz); 3.71 (dd, 0.7H, H-1a-*E*, J²_{1b-1a}=10.2Hz, J³_{1a-2}=4.7Hz); 3.15-3.00 (m, 2H, H-24); 2.20-1.90 (m, 2H, H-15); 1.43 (s, 9H, H-28,29,30); 1.40-1.15 (m, 16H, H-16 to H-23).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 159.6 (C-10); 157.2 (C-5); 155.0 (C-26); 152.0 (C-4-*E*); 151.7 (C-4-*Z*); 129.7 (C-8,12-*Z*); 129.6 (C-8,12-*E*); 127.1 (C-7); 114.4 (C-9,11); 106.8 (C-14-*Z*); 106.7 (C-14-*E*); 78.7 (C-27); 75.7 (C-3-*Z*); 73.2 (C-3-*E*); 71.3 (C-1-*Z*); 70.6 (C-1-*E*); 58.2 (C-2-*E*); 57.8 (C-2-*Z*); 55.3 (C-13); 46.6 (C-6-*E*); 46.5 (C-6-*Z*); 40.6 (C-24); 30.1, 29.5, 29.4, 29.3, 29.1, 28.4, 26.8, 26.7 (C-15 to C-23), 28.4 (C-28,29,30).

HRMS m/z: calcd for C₂₉H₄₄N₂O₆Na [M+Na]⁺: 539.3097; found: 539.3104.

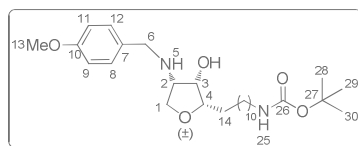
tert-butyl-11-(3-(4-methoxybenzyl)-2-oxohexahydrofuro[3,4-d]oxazol-6-yl)undecyl)carbamate (236)

Prepared from **(235)** (940mg, 1.82mmol, 1 eq) according to general procedure for tetrahydrofuro[3,4]oxazolidinone reduction to give compound **(236)** (878mg, 93%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.22-7.19 (m, 2H, H-8,12); 6.90-6.87 (m, 2H, H-9,11); 4.76 (dd, 1H, H-3, $J^3_{3-2}=7.8\text{Hz}$, $J^3_{3-4}=3.9\text{Hz}$); 4.71 (d, 1H, H-6a, $J^2=15.2\text{Hz}$); 4.55-4.45 (bs, 1H, H-25); 4.08 (d, 1H, H-6b, $J^2=15.1\text{Hz}$); 4.07 (dd, 1H, H-2, $J^3_{2-3}=7.7\text{Hz}$, $J^3_{2-1b}=3.9\text{Hz}$); 3.94 (d, 1H, H-1a, $J^2_{1a-1b}=10.6\text{Hz}$); 3.81 (s, 3H, H-13); 3.49 (td, 1H, H-4, $J^3_{4-14}=6.9\text{Hz}$, $J^3_{4-3}=3.9\text{Hz}$); 3.30 (dd, 1H, H-1b, $J^2_{1a-1b}=10.6\text{Hz}$, $J^3_{1b-2}=4.1\text{Hz}$); 3.15-3.00 (m, 2H, H-24); 1.82-1.70 (m, 2H, H-14); 1.45 (s, 9H, H-28,29,30); 1.40-1.15 (m, 18H, H-15 to H-23).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 159.5 (C-10); 157.6 (C-5); 156.2 (C-26); 129.6 (C-8,12); 127.4 (C-7); 114.3 (C-9,11); 83.5 (C-4); 78.7 (C-27); 77.8 (C-3); 69.3 (C-1); 59.9 (C-2); 55.3 (C-13); 46.2 (C-6); 40.6 (C-24), 30.0, 29.7, 29.5, 29.2, 26.7, 26.2 (C-14 to C-23), 28.4 (C-28,29,30).

HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 519.3434; found: 519.3427.

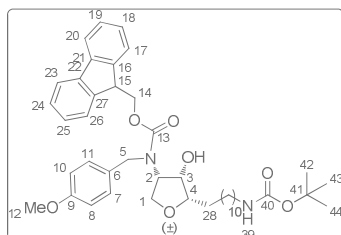
tert-butyl-11-(3-hydroxy-4-(4-methoxybenzylamino)tetrahydrofuran-2-yl)undecyl)carbamate (237)

Prepared from **(236)** (330mg, 0.636mmol) according to the general procedure for oxazolidinone hydrolysis to give **(237)** (291mg, 92%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.25-7.15 (m, 2H, H-8,12); 6.90-6.80 (m, 2H, H-9,11); 4.60-4.40 (bs, 1H, H-25); 3.91 (dd, 1H, H-3, $J^3_{3-2}=4.7\text{Hz}$, $J^3_{3-4}=3.1\text{Hz}$); 3.90 (t, 1H, H-1a, $J^2_{1a-1b}=J^3_{1a-2}=8.0\text{Hz}$); 3.79 (s, 3H, H-13); 3.72 (AB, 2H, H-6, $J^2_{AB}=13.0\text{Hz}$, $\delta\Delta=0.04\text{ppm}$); 3.69 (td, 1H, H-4, $J^3_{4-5}=6.9\text{Hz}$, $J^3_{4-3}=3.0\text{Hz}$); 3.53 (t, 1H, H-1b, $J^2_{1b-1a}=J^3_{1b-2}=7.3\text{Hz}$); 3.41 (td, 1H, H-2, $J^3_{2-1b}=J^3_{2-1a}=7.4\text{Hz}$, $J^3_{2-3}=4.8\text{Hz}$); 3.15-3.00 (m, 2H, H-24); 2.75-2.55 (bs, 1H, H-5); 1.82-1.70 (m, 2H, H-14); 1.43 (s, 9H, H-28,29,30); 1.40-1.15 (m, 18H, H-15 to H-23).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 158.9 (C-10); 155.9 (C-26); 131.2 (C-7); 129.3 (C-8,12); 113.9 (C-9,11); 83.4 (C-4); 78.8 (C-27); 70.3 (C-1); 69.6 (C-3); 61.0 (C-2); 55.2 (C-13); 52.0 (C-6); 40.6 (C-24); 30.0, 29.7, 29.5, 29.2, 26.7, 26.2 (C-14 to C-23), 28.4 (C-28,29,30).

HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 493.3641; found: 493.3623.

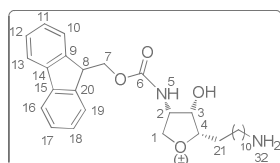
(9H-fluoren-9-yl)methyl-(5-(11-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)undecyl)-4-hydroxytetrahydrofuran-3-yl)(4-methoxybenzyl)carbamate (238)

To a solution of aminoalcohol (**237**) (106mg, 0.215mmol, 1 eq) in THF (2.65mL) and saturated aqueous Na₂CO₃ (1.0 mL) was added Fmoc-Cl (66.7mg, 0.258mmol, 1.2 eq) at 0°C. The reaction mixture was stirred at the same temperature for 2h. Then, the reaction was quenched with a saturated solution of NH₄Cl. The mixture was extracted with EtOAc and the combined organic extracts were dried over magnesium sulfate and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (Et₂O/EP 5:5 to 6:4) to give the compound (**238**) as a white solid (145 mg, 94%).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7.74-7.71 (m, 2H, H-20,23); 7.50-7.42 (m, 2H, H-17,26); 7.37 (m, 2H, H-19,24); 7.28-7.23 (m, 2H, H-18,25); 6.98-6.95 (m, 2H, H-7,11); 6.82-6.79 (m, 2H, H-8,10); 4.60-4.50 (m, 4H, H-39, 5a, 14); 4.33 (d, 1H, H-5b, J²=15.9Hz); 4.20 (t, 1H, H-15, J³₁₅₋₁₄=5.4Hz); 4.12 (dd, 1H, H-3, J³₃₋₄=7.2Hz, J³₃₋₂=6.9Hz); 4.10-4.00 (m, 1H, H-1a); 3.97-3.89 (m, 1H, H-2); 3.79 (s, 3H, H-12); 3.65-3.43 (m, 2H, H-1b, 4); 3.15-3.00 (m, 2H, H-38); 1.68-1.50 (m, 2H, H-28); 1.45 (s, 9H, H-42,43,44); 1.37-1.21 (m, 18H, H-29 to H-37).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz,) δ (ppm): 158.9 (C-9); 155.8 (C-40); 152.8 (C-13); 143.7 (C-16,27); 141.3 (C-21,22); 127.7 (C-7,11); 127.5 (C-19,24); 127.0 (C-20,23); 124.7 (C-18,25); 119.9 (C-17,26); 114.0 (C-8,10); 82.3 (C-4); 73.0 (C-3); 68.5 (C-1); 66.1 (C-14); 64.9 (C-2); 55.2 (C-12); 50.3 (C-5); 47.3 (C-15); 40.6 (C-38); 30.0, 29.7, 29.5, 29.2, 28.7, 26.7, 26.0 (C-28 to C-37); 28.4 (C-42,43,44).

HRMS *m/z*: calcd for C₄₃H₅₉N₂O₇ [M+H]⁺: 715.4322; found: 715.4318.

(9H-fluoren-9-yl)methyl (5-(11-aminoundecyl)-4-hydroxytetrahydrofuran-3-yl)carbamate (239a)

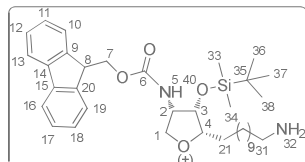
To a solution of (**238**) (116mg, 0.162mmol, 1 eq) in anhydrous CH₂Cl₂ (7.25mL) at 0°C under nitrogen was added TFA (1.24mL, 16.2mmol, 100 eq). The mixture was stirred overnight and allowed to warm to room temperature. After evaporation of the solvent under vacuum, the residue was purified by flash chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/EtOH/MeOH/NH₃ aq. 90:5:2:2) to give compounds (**239a**) and (**239b**) as a white solid (67 mg, 83%).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7.70-7.60 (m, 2H, H-13,16); 7.55-7.45 (m, 2H, H-10,19); 7.35-7.25 (m, 2H, H-12,17); 7.25-7.15 (m, 2H, H-11,18); 4.35-4.25 (m, 2H, H-7); 4.25-4.15 (m, 1H, H-8); 4.12-4.08 (m, 1H, H-3); 3.98-3.88 (m, 2H, H-1a, 2); 3.70-3.60 (m, 1H, H-1b); 3.53-3.45 (m, 1H, H-4); 2.58 (t, 2H, H-31, J³₃₁₋₃₂=6.6Hz); 1.55-1.46 (m, 2H, H-21); 1.40-1.10 (m, 18H, H-22 to H-30).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 143.6 (C-9,20); 141.1 (C-14,15); 127.5 (C-12,17); 126.8 (C-13,16); 124.8 (C-11,18); 119.7 (C-10,19); 82.4 (C-4); 70.7 (C-3); 69.4 (C-1); 66.6 (C-7); 54.1 (C-2); 46.9 (C-8); 40.9 (C-31); 31.6, 29.5, 29.2, 29.0, 28.7, 26.5, 25.7 (C-21 to C-30).

HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 495.3223; found: 495.3214.

(9H-fluoren-9-yl)methyl-5-(11-aminoundecyl)-4-(tert-butyldimethylsilyloxy)tetrahydrofuran-3-ylcarbamate (240)



A: Prepared from **(239)** (140mg, 0.307mmol, 1 eq) according to general procedure for *O*-silylation. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ aq. 97.8:2:0.2) to give **(240)** (88mg, 47%).

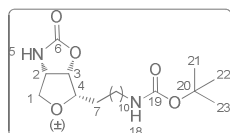
B: To a solution of **(244)** (155mg, 0.219mmol, 1 eq) in anhydrous CH_2Cl_2 (9.8mL) at 0°C under nitrogen was added TFA (2.10mL, 21.9mmol, 100 eq). The mixture was stirred at 0°C for 1 hour. Then a NaHCO_3 saturated aqueous solution was added and the mixture was extracted with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1). The combined organic layers were washed with NaHCO_3 saturated aqueous solution, water and brine, dried over magnesium sulfate and evaporate to dryness. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ aq. 97.8:2:0.2) to give **(240)** (111mg, 83%).

^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.75 (d, 2H, H-13,16, $J^3=7.5\text{Hz}$); 7.64 (d, 2H, H-10,19, $J^3=7.5\text{Hz}$); 7.38 (t, 2H, H-12,17, $J^3=7.5\text{Hz}$); 7.32 (t, 2H, H-11,18, $J^3=7.5\text{Hz}$); 4.19 (t, 1H, H-8, $J^3_{7-8}=6.3\text{Hz}$); 4.00-3.91 (m, 1H, H-3); 3.91-3.86 (m, 1H, H-1a); 3.86-3.76 (m, 1H, H-4); 3.56-3.39 (m, 2H, H-2, 1b); 3.15 (d, 2H, H-7, $J^3_{7-8}=6.3\text{Hz}$); 2.94-2.60 (bt, 4H, H-31+ NH_2 , $J^3_{31-30}=7.2\text{Hz}$); 1.56 -1.16 (m, 20H, H-21 to H-30); 0.95 (s, 9H, H-36,37,38); 0.11 (s, 3H, H-33,34); 0.09 (s, 3H, H-33,34).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 145.2 (C-9,20); 141.0 (C-14,15); 127.5 (C-12,17); 127.1 (C-13,16); 124.7 (C-11,18); 120.0 (C-10,19); 82.4 (C-4); 74.5 (C-3); 71.6 (C-1); 55.8 (C-2); 52.5 (C-7); 49.6 (C-31); 47.0 (C-8); 30.5, 29.7, 29.6, 29.5, 29.3, 28.9, 27.1, 26.5 (C-21 to C-30); 25.9 (C-36,37,38); 18.3 (C-35); -4.2, -4.7 (C-33,34).

HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{57}\text{N}_2\text{O}_4\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 609.4088; found: 609.4090.

tert-butyl-(11-(2-oxohexahydrofuro[3,4-d]oxazol-6-yl)undecyl)carbamate (241)



Prepared from **(236)** (400mg, 0.772mmol, 1 eq) according to general procedure for oxidative cleavage of *N*-PMB. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel ($\text{Et}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 50:50 to 70:30) to give **(241)** as a white solid (240mg, 78%).

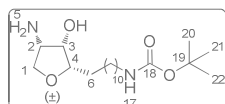
^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 6.96 (bs, 1H, H-5); 4.88 (dd, 1H, H-3, $J^3_{3-2}=7.5\text{Hz}$, $J^3_{3-4}=3.9\text{Hz}$); 4.58 (bs, 1H, H-18); 4.33 (dd, 1H, H-2, $J^3_{2-3}=7.5\text{Hz}$, $J^3_{2-1b}=3.9\text{Hz}$); 3.89 (d, 1H, H-1a, $J^2_{1a-1b}=10.2\text{Hz}$); 3.45 (dd,

^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 1H, H-1b, $J^2_{1b-1a}=10.5\text{Hz}$, $J^3_{1b-2}=4.2\text{Hz}$; 3.44 (q, 1H, H-4, $J^3_{4-5}=J^3_{4-3}=2.1\text{Hz}$); 3.09-3.00 (m, 2H, H-17); 1.75-1.66 (m, 2H, H-7); 1.39 (s, 9H, H-21,22,23); 1.30-1.16 (m, 18H, H-8 to H-16).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 159.6 (C-6); 155.8 (C-19); 83.0 (C-4); 80.7 (C-3); 78.8 (C-20); 73.2 (C-1); 57.1 (C-2); 40.5 (C-17); 29.9, 29.4, 29.4, 29.3, 29.3, 29.1, 28.0, 26.7, 25.9 (C-7 to C-16), 28.3 (C-21,22,23).

HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 399.2859; found: 399.2869.

tert-butyl (11-(4-amino-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)undecyl)carbamate (242)



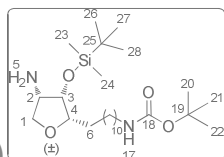
Prepared from **(241)** (336mg, 0.844mmol, 1 eq) according to general procedure for oxazolidinone hydrolysis. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{EtOH}/\text{NH}_3$ aq. 94:3:2:1) to give **(242)** as a white solid (287mg, 91%).

^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 4.70-4.60 (bs, 1H, H-17); 3.85 (dd, 1H, H-1a, $J^2_{1a-1b}=8.4\text{Hz}$, $J^3_{1a-2}=7.2\text{Hz}$); 3.81 (dd, 1H, H-3, $J^3_{3-2}=4.1\text{Hz}$, $J^3_{3-4}=3.6\text{Hz}$); 3.68 (td, 1H, H-4, $J^3_{4-6}=6.9\text{Hz}$, $J^3_{4-3}=3.6\text{Hz}$); 3.54 (dd, 1H, H-1b, $J^2_{1b-1a}=8.4\text{Hz}$, $J^3_{1b-2}=7.0\text{Hz}$); 3.48-3.40 (m, 1H, H-2); 3.02 (bq, 2H, H-16, $J^3_{16-15}=6.3\text{Hz}$); 2.4-2.3 (bs, 2H, H-5); 1.65-1.52 (m, 2H, H-6); 1.38 (s, 9H, H-20,21,22); 1.32-1.12 (m, 18H, H-7 to H-15).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 156.0 (C-18); 82.9 (C-4); 78.8 (C-19); 72.1 (C-1); 71.6 (C-3); 54.4 (C-2); 40.5 (C-16); 29.9, 29.6, 29.4, 29.3, 29.1, 26.6, 26.1 (C-6 to C-15), 28.3 (C-20,21,22).

HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 373.3066; found: 373.3065.

tert-butyl-11-(4-amino-3-(tert-butyldimethylsilyloxy)tetrahydrofuran-2-yl)undecylcarbamate (243)

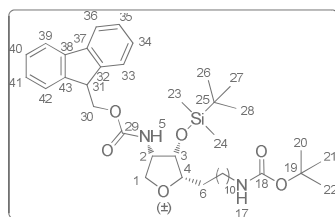


Prepared from **(242)** (170mg, 0.457mmol, 1 eq) according to general procedure for *O*-silylation. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ aq. 98:1:1 to 97:2:1) to give **(243)** as a yellow oil (207mg, 93%).

^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 4.59 (bs, 1H, H-17); 3.93-3.87 (m, 1H, H-3); 3.87-3.82 (m, 1H, H-1a); 3.82-3.75 (m, 1H, H-4); 3.48-3.38 (m, 2H, H-2, 1b); 3.10-3.00 (bq, 2H, H-16, $J^3_{16-15}=6.6\text{Hz}$); 1.39 (s, 9H, H-20,21,22); 1.28-1.18 (m, 20H, H-6 to H-15); 0.91 (s, 9H, H-26,27,28); 0.08 (s, 3H, H-23,24); 0.06 (s, 3H, H-23,24).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 155.9 (C-18); 82.4 (C-4); 78.8 (C-19); 74.5 (C-3); 71.6 (C-1); 55.8 (C-2); 40.5 (C-16); 30.5, 30.0, 29.7, 29.5, 29.4, 29.2, 26.7, 26.4 (C-6 to C-15); 28.3 (C-20,21,22); 25.9 (C-26,27,28); 18.2 (C-25); -4.2, -4.5 (C-23,24).

HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{55}\text{N}_2\text{O}_4\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 487.3931; found: 487.3914.

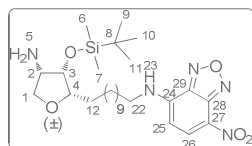
(9H-fluoren-9-yl)methyl-(5-(11-*tert*-butylaminoundecylcarbamoyl)-4-(*tert*-butyldimethylsilyloxy) tetrahydrofuran-2-yl)carbamate (244)

To a solution of **(243)** (88mg, 0.181mmol, 1 eq) in THF (2.2mL) and Na_2CO_3 saturated aqueous solution (0.83mL) was added Fmoc-Cl (56.6mg, 0.219mmol, 1.2 eq) at 0°C. The reaction mixture was stirred at the same temperature for 3h. Then, the reaction was quenched by addition of a saturated solution of NH_4Cl . The mixture was extracted with EtOAc and the combined organic extracts were dried over sodium sulfate and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (EP/Et₂O 6:4 to 5:5) to give the compound **(244)** (116mg, 90%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.74 (d, 2H, H-36,39, $J^3=7.5\text{Hz}$) ; 7.57 (t, 2H, H-33,42, $J^3=6.3\text{Hz}$), 7.39 (t, 2H, H-35-40, $J^3=7.5\text{Hz}$), 7.29 (t, 2H, H-34-41, $J^3=7.5\text{Hz}$) ; 5.10 (d, 1H, H-5) ; 4.65-4.50 (bs, 1H, H-17) ; 4.41 (d, 2H, H-30, $J^3_{30-31}=6.6\text{Hz}$) ; 4.35-4.25(m, 1H, H-2) ; 4.19 (t, 1H, H-31, $J^3_{30-31}=6.6\text{Hz}$), 4.12 (t, 1H, H-3, $J^3_{3-4}=J^3_{3-2}=4.5\text{Hz}$) ; 3.91 (t, 1H, H-1a, $J^2_{1a-1b}=J^3_{1a-2}=7.5\text{Hz}$) ; 3.80-3.70 (m, 1H, H-4) ; 3.62 (dd, 1H, H-1b, $J^2_{1a-1b}=7.5\text{Hz}$, $J^3_{1b-2}=0.9\text{Hz}$) ; 3.09 (bq, 2H, H-16, $J^3=6.6\text{Hz}$) ; 1.44 (s, 9H, H-20,21,22); 1.36-1.24 (m, 20H, H-6 to H-15); 0.92 (s, 9H, H-26,27,28); 0.07 (s, 3H, H-23,24); 0.00 (s, 3H, H-23,24).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 155.9 (C-18) ; 155.7 (C-29) ; 143.7 (C-32,43) ; 141.2 (C-37,38); 127.6 (C-35,40); 126.9 (C-36,39); 124.9 (C-34,41); 119.9 (C-33,42); 82.4 (C-4); 78.8 (C-19); 72.4 (C-3); 70.1 (C-1); 66.6 (C-30); 54.0 (C-2); 47.1 (C-31); 40.5 (C-16); 30.0, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 26.7, 26.3 (C-6 to C-15); 28.3 (C-20,21,22); 25.7(C-26,27,28); 18.1 (C-25); -4.7, -5.0 (C-23,24).

HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{41}\text{H}_{64}\text{N}_2\text{O}_6\text{SiNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 731.4431; found: 731.4434.

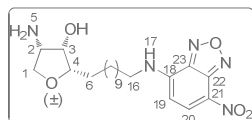
***N*-(11-(4-amino-3-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)tetrahydrofuran-2-yl)undecyl)-7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-amine (245)**

Triethylamine (45 μL , 0.324mmol, 2 eq) was added to a solution of **(240)** (88mg, 0.162mmol, 1 eq) in anhydrous THF (1.5mL). Then a solution of NBD-chloride (36mg, 0.180mmol, 1.1 eq) in anhydrous THF (1.5mL) was added, and the reaction mixture was stirred at room temperature, in the dark and under nitrogen. After 20 hours, the reaction mixture was diluted with EtOAc and washed with water. The aqueous layer was extracted with EtOAc and the combined organic layers were dried over magnesium sulfate and evaporated to dryness. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel in the dark ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ aq. 96:3:1 to 94:5:1) to give the compound **(245)** as a brown oil (29mg, 32%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 8.49 (d, 1H, H-20, $J^3_{25-26}=8.4\text{Hz}$); 6.16 (d, 1H, H-25, $J^3_{25-26}=8.4\text{Hz}$); 3.98-3.93 (m, 1H, H-3); 3.90-3.86 (m, 1H, H-1a); 3.86-3.78 (m, 1H, H-4); 3.55-3.40 (m, 2H, H-2, 1b); 1.57-1.20 (m, 20H, H-12 to H-21), 0.94 (s, 9H, H-9,10,11); 0.11 (s, 3H, H-6,7); 0.09 (s, 3H, H-6,7).

MS (ESI): $m/z=550.3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

4-amino-2-(11-(7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-ylamino)undecyl)tetrahydrofuran-3-ol or jaspine B-NBD (**246**)

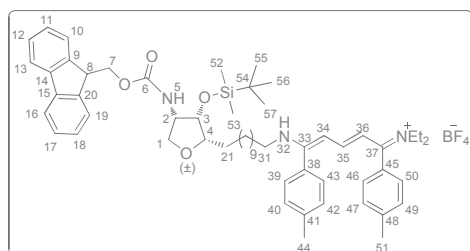


To a solution of (**245**) (10mg, 0.0182mmol, 1 eq) in methanol (0.5mL) was added a solution of $\text{NH}_4\text{HF} \cdot \text{HF}$ (3 μL , 0.0522mmol, 2.9 eq) in methanol (0.5mL). The reaction mixture was stirred in the dark at room temperature for 24 hours, and quenched by addition of silica gel. Then the mixture was diluted with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1) and filtrated through celite. The filtercake was washed with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1), and the filtrate was evaporated to dryness. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel in the dark ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{EtOH}/\text{NH}_3$ aq. 94:3:2:1 to 90:10:0:0) to give the (**246**) as an orange solid (4mg, 50%). This compound revealed to be unstable after isolation.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 8.50 (d, 1H, H-20, $J^3_{19-20}=8.7\text{Hz}$); 6.16 (d, 1H, H-19, $J^3_{19-20}=8.7\text{Hz}$); 3.95-3.90 (m, 1H, H-3); 3.90-3.85 (m, 1H, H-1a); 3.75-3.65 (m, 1H, H-4); 3.55-3.45 (m, 4H, H-2, 1b, 16); 1.37-1.20 (m, 20H, H-6 to H-15).

MS (Cl/NH_3): $m/z=436.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

1((2E,4E)-5-(11-(4-((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)-3-(tert-butyldimethylsilyloxy)-tetrahydrofuran-2-yl)undecylamino)-5-diethylamino-1,5-bis(4-methylphenyl)penta-1,3-dienylium tetrafluoroborate (**247**)



To a solution of 1-ethoxy-5-diethylamino-1,5-bis(4-methylphenyl)penta-1,3-dienylium tetrafluoroborate⁹³ (22mg, 0.049mmol, 1 eq) in MeCN (0.5mL) was added (**240**) (30mg, 0.049mmol, 1 eq) dissolved in a mixture $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$ (1/1.5mL) and triethylamine (7 μL , 1 eq). After 48h stirring, the mixture was evaporated until dryness and the crude product was purified by flash chromatography on silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2 to 95:5) to give (**247**) as a yellow oil (31mg, 62%).

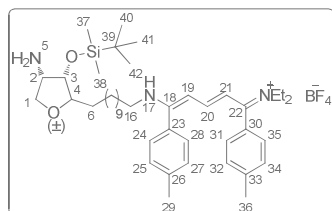
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 8.70-8.60 (bs, 1H, H-5); 7.80-7.70 (m, 2H, H-13,16); 7.63-7.53 (m, 2H, H-10-19); 7.45-7.35 (m, 2H, H-12,17); 7.35-7.30 (m, 2H, H-11,18); 7.15-6.90 (m, 8H, H-39,40,42,43,46,47,49,50); 6.60-5.90 (m, 3H, H-34,35,36); 4.41 (d, 2H, H-7, $J^3_{7-8}=6.6\text{Hz}$); 4.30 (t, 1H, H-2, $J^3_{2-1a}=J^3_{2-3}=6.3\text{Hz}$); 4.19 (t, 1H, H-8, $J^3_{8-7}=6.6\text{Hz}$); 4.13 (t, 1H, H-3, $J^3_{3-4}=4.5\text{Hz}$); 3.90 (t, 1H, H-1a, $J^2_{1a-1b}=J^3_{1a-2}=7.9\text{Hz}$); 3.80-3.67 (m, 1H, H-4); 3.67-3.57 (m, 1H, H-1b); 3.55-3.45 (m, 2H, CH_2 Et₂N); 3.30-3.20 (m, 2H, CH_2 Et₂N); 3.10 (t, 1H, H-31, $J^3=7.5\text{Hz}$); 2.32 (s, 3H, H-44); 2.31 (s, 3H, H-51); 1.80-1.65

(m, 2H, H-21); 1.43 -1.02 (m, 2H, H-22 to H-30+ CH_3 Et₂N); 0.92 (s, 9H, H-55,56,57); 0.07 (s, 3H, H-52,53); 0.04 (s, 3H, H-52,53).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 169.3, 169.1 (C-33,37); 162.2 (C-35); 155.8 (C-6); 143.9 (C-9,20); 141.3 (C-14,15); 139.9 (C-41,48); 130.8, 129.9 (C-38,45); 129.3, 129.0, 128.9, 127.9, 127.7, 127.0, 124.9, 120.0 (C-39,46,42,49,40,47,43,50,12,17,13,16,11,18,10,19); 105.6, 102.3 (C-34,36); 82.4 (C-4); 72.5 (C-3); 70.2 (C-1); 66.7 (C-7); 54.0 (C-2); 47.1 (C-8); 44.9 (C-31); 29.7, 29.6, 29.5, 29.5, 29.2, 28.4, 26.9, 26.3 (C-21 to C-30 + C-NEt₂); 25.7 (C-55,56,57); 21.3, 21.1 (C-44,51); 18.1 (C-54); 14.2, 12.4 (C-NEt₂); -4.6, -4.9 (C-52,53).

MS (MALDI-tof) : m/z 924.61 (M^+ , 100%).

1-((2E,4E)-5-(11-(4-amino-3-(tert-butyldimethylsilyloxy)tetrahydrofuran-2-yl)undecylamino)-5-diethylamino-1,5-bis(4-methylphenyl)penta-1,3-dienylium tetrafluoroborate (248)



To a solution of **(247)** (31mg, 0.0306mmol, 1 eq) in CH₂Cl₂ (2.2 mL) under nitrogen was added NHEt₂ (320 μ L, 3.06mmol, 100 eq). The mixture was stirred overnight in dark. After evaporation of the solvent under vacuum, the residue was purified by flash chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/ MeOH 98:2 to 90:10) to give the compound **(248)** (18 mg, 74%).

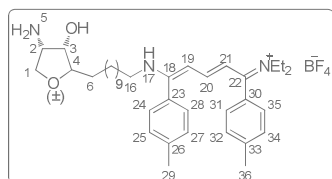
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7.13-6.80 (m, 8H, H-24,25,27,28,31,32,34,35); 6.60-6.45 (m, 1H, H-20); 6.10-5.90 (m, 2H, H-19,21); 3.92 (t, 1H, H-3, $J^3_{3-4} = J^3_{3-2} = 3.6\text{Hz}$); 3.88-3.84 (m, 1H, H-1a); 3.82-3.77 (m, 1H, H-4); 3.49 (m, 4H, H-1b, 2+ CH_2 Et₂N); 3.10-3.05 (m, 2H, H-16); 2.31 (bs, 6H, H-29,36); 1.75-1.65 (m, 2H, H-6); 1.57-1.17 (m, 18H, H-7 to H-15); 1.14 (t, 6H, CH_3 Et₂N); 0.92 (s, 9H, H-40,41,42); 0.09 (s, 3H, H-37,38); 0.07 (s, 3H, H-37,38).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 169.1 (C-18,22); 162.1 (C-20); 141.2, 139.9 (C-26,33); 130.8, 129.8, 129.2, 128.9, 128.8, 127.9 (C-23,30,24,31,27,34,25,32,28,35); 105.5, 102.3 (C-19,21); 82.5 (C-4); 74.5 (C-3); 71.6 (C-1); 55.8 (C-2); 44.9 (C-16); 30.5, 29.7, 29.5, 29.4, 28.9, 28.4, 28.3, 26.9, 26.4 (C-6 to C-15 + CH_2 Et₂N); 25.9 (C-40,41,42); 21.3, 21.1 (C-29,36); 18.2 (C-39); 14.4 (CH_3 Et₂N); -4.2, -4.5 (C-37,38).

¹⁹F-NMR (CDCl₃, 282 MHz) δ (ppm): -152.3

HRMS m/z : calcd for C₄₄H₇₂N₃O₂Si [M]⁺: 702.5419; found: 702.5394.

1-(5-(11-(4-amino-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)undecylamino)-diethylamino-1,5-bis(4-methylphenyl)penta-1,3-dienylium tetrafluoroborate (249)



To a solution of **(248)** (60mg, 75.9 μ mol, 1 eq) in MeOH (3mL) under nitrogen was added a solution of NH₄HF.HF (13 μ L, 0.2280mmol, 3 eq) in MeOH (2mL). The mixture was stirred 24h in the dark at room temperature. The reaction was quenched with silica gel (1g).

After 30 minutes of stirring, the solution was diluted with CH₂Cl₂/MeOH (9:1), filtered on celite and concentrated. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/ MeOH 90:10 to 80:20) to give the compound **(249)** (21mg, 42%).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7.95-7.75 (bs, 2H, H-5); 7.35-7.10 (m, 8H, H-24, 25, 27, 28, 31, 32, 34,35); 6.62 (t, 1H, H-20, J³₂₀₋₁₉= J³₂₀₋₂₁=13.2Hz); 6.31, 6.12 (2xd, 2x1H, H-19,21, J³=13.2Hz); 4.40-4.35 (m, 1H, H-3); 4.05-3.90 (m, 3H, H-1a, 2, 17); 3.85-3.70 (m, 3H, H-4+ CH₂ Et₂N); 3.50-3.40 (m, 3H, H-1b + CH₂ Et₂N); 3.40-3.30 (m, 2H, H-16); 2.44 (s, 6H, H-29,36); 1.80-1.60 (m, 2H, H-6); 1.55-1.30 (m, 21H, H-7 to H-15 + CH₃ Et₂N); 1.20-1.10 (m, 3H CH₃ Et₂N).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 171.1, 169.2 (C-18,22); 162.7 (C-20); 142.2, 140.9 (C-26,33); 131.9, 130.9 (C-23,30); 130.0, 129.9, 129.8, 128.9 (C-24,31,27,34,25,32,28,35); 106.9, 102.2 (C-19,21); 83.3 (C-4); 70.5 (C-3); 68.5 (C-1); 54.6 (C-2); 49.1 (C-16); 45.8, 45.2 (CH₂ Et₂N); 30.3, 30.2, 30.1, 30.0, 29.8, 29.3, 28.8, 27.4, 26.7 (C-6 to C-15); 21.3, 21.2 (C-29,36); 14.2, 12.7 (CH₃ Et₂N).

¹⁹F-NMR (CDCl₃, 282 MHz) δ (ppm): -151.7

HRMS *m/z*: calcd for C₃₈H₅₈N₃O₂ [M]⁺: 588.4536; found: 588.4529.

UV (EtOH): λ_{max} = 439 nm, ε = 59 545 L.mol⁻¹.cm⁻¹.

Fluorescence (EtOH): λ_{ex} = 439 nm, λ_{em} = 501 nm.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Skehan, P. S., R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *J. Nat. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107-1112.
2. Vichai, V. K., K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1112-1116.
3. Denizot, F. L., R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *J. Immunol. Methods* **1986**, *89*, 271-277.
4. Kuroda, I.; Musman, M.; Ohtani, I. I.; Ichiba, T.; Tanaka, J.; Gravalos, D. G.; Higa, T. Pachastrissamine, a cytotoxic anhydrophytosphingosine from a marine sponge, *Pachastrissa* sp. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1505-1506.
5. Ledroit, V.; Debitus, C.; Lavaud, C.; Massiot, G. Jaspines A and B: two new cytotoxic sphingosine derivatives from the marine sponge *Jaspis* sp. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 225-228.
6. Bhaket, P.; Morris, K.; Stauffer, C. S.; Datta, A. Total Synthesis of Cytotoxic Anhydrophytosphingosine Pachastrissamine (Jaspine B). *Org. Lett.* **2005**, *7*, 875-876.
7. Salma, Y. Essais de thérapie anti-tumorale applicable au mélanome par ciblage du métabolisme des sphingolipides. PhD thesis, Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2010.
8. Canals, D.; Mormeneo, D.; Fabrias, G.; Llebaria, A.; Casas, J.; Delgado, A. Synthesis and biological properties of pachastrissamine (-jaspine B) and diastereoisomeric jaspines. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 235-241.
9. Yoo, H. L., Y. S.; Lee, S.; Kim, S.; Kim, T. Y. Pachastrissamine from *Pachastrissa* sp. Inhibits Melanoma Cell Growth by Dual Inhibition of Cdk2 and ERK-mediated FOXO3 Downregulation. *Phytother. Res.* **2012**, *26*, 1927-1933.
10. Ghosal, P. A., S.; Meena, S.; Sinha, S.; Shaw, A.K. Stereoselective total synthesis of Jaspine B (Pachastrissamine) utilizing iodocyclization and an investigation of its cytotoxic activity. *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, *24*, 903-908.
11. Salma, Y.; Lafont, E.; Therville, N.; Carpentier, S.; Bonnafe, M. J.; Levade, T.; Génisson, Y.; Andrieu-Abadie, N. The natural marine anhydrophytosphingosine, jaspine B, induces apoptosis in melanoma cells by interfering with ceramide metabolism. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *78*, 477-485.
12. Martinkova, M. M., E.; Fabisikova, M.; Gonda, J.; Pilatova, M.; Mojzis, J. Total synthesis of pachastrissamine together with its 4-epi-congener via [3,3]-sigmatropic rearrangements and antiproliferative/cytotoxic evaluation. *Carbohydr. Res.* **2015**, *402*, 6-24.
13. Xu, J.-M. Z., E.; Shi, X.-J.; Wang, Y.-C.; Yu, B.; Jiao, W.-W.; Guo, Y.-Z.; Liu, H.-M. Synthesis and preliminary biological evaluation of 1,2,3-triazole-Jaspine B hybrids as potential cytotoxic agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *80*, 593-604.
14. Jeon, H.; Bae, H.; Baek, D. J.; Kwak, Y.-S.; Kim, D.; Kim, S. Syntheses of sulfur and selenium analogues of pachastrissamine via double displacements of cyclic sulfate. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7237-7242.
15. Santos, C.; Fabing, I.; Saffon, N.; Ballereau, S.; Génisson, Y. Rapid access to jaspine B and its enantiomer. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 7227-7233.
16. Lui, J. D., Y.; Dong, X.; Meng, S.; Xia, J.; Cheng, L. Stereoselective synthesis of jaspine B from D-xylose. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 2653-2657.

17. Rives, A.; Ladeira, S.; Levade, T.; Andrieu-Abadie, N.; Génisson, Y. Synthesis of Cytotoxic Aza Analogues of Jaspine B. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 7920-7923.
18. Yoshimitsu, Y.; Oishi, S.; Miyagaki, J.; Inuki, S.; Ohno, H.; Fujii, N. Pachastrissamine (jaspine B) and its stereoisomers inhibit sphingosine kinases and atypical protein kinase C. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 5402-5408.
19. Myatt, S. S. L., E. W.-F. The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, 7, 847-859.
20. Kwon, Y.; Song, J.; Bae, H.; Kim, W.-J.; Lee, J.-Y.; Han, G.-H. Synthesis and Biological Evaluation of Carbocyclic Analogues of Pachastrissamine. *Mar. Drugs* **2015**, 13, 824-837.
21. Yoshimitsu, Y. M., J.; Oishi, S.; Fujii, N.; Ohno, H. Synthesis of pachastrissamine (jaspine B) and its derivatives by the late-stage introduction of the C-2 alkyl side chains using olefin cross metathesis. *Tetrahedron* **2013**, 69, 4211-4220.
22. Salma, Y.; Ballereau, S.; Maaliki, C.; Ladeira, S.; Andrieu-Abadie, N.; Génisson, Y. Flexible and enantioselective access to jaspine B and biologically active chain-modified analogues thereof. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 3227-3243.
23. Salma, Y.; Ballereau, S.; Ladeira, S.; Lepetit, C.; Chauvin, R.; Andrieu-Abadie, N.; Génisson, Y. Single- and double-chained truncated jaspine B analogues: asymmetric synthesis, biological evaluation and theoretical study of an unexpected 5-endo-dig process. *Tetrahedron* **2011**, 67, 4253-4262.
24. van den Berg, R. J. B. H. N.; Boltje, T. J.; Verhagen, C. P.; Litjens, R. E. J. N.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S. An Efficient Synthesis of the Natural Tetrahydrofuran Pachastrissamine Starting from d-ribo-Phytosphingosine. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 836-839.
25. Zheng, T.; Narayan, R. S.; Schomaker, J. M.; Borhan, B. One-Pot Regio- and Stereoselective Cyclization of 1,2,n-Triols. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 6946-6947.
26. Lee, T.; Lee, S.; Kwak, Y. S.; Kim, D.; Kim, S. Synthesis of Pachastrissamine from Phytosphingosine: A Comparison of Cyclic Sulfate vs an Epoxide Intermediate in Cyclization. *Org. Lett.* **2007**, 9, 429-432.
27. Bae, H.; Jeon, H.; Baek, D. J.; Lee, D.; Kim, S. Stereochemically Reliable Syntheses of Pachastrissamine and Its 2-epi-Congener via Oxazolidinone Precursors from an Established Starting Material N-tert-Butoxycarbonyl-Protected Phytosphingosine. *Synthesis* **2012**, 44, 3609-3612.
28. Canals, D.; Mormeneo, D.; Fabriàs, G.; Llebaria, A.; Casas, J.; Delgado, A. Synthesis and biological properties of Pachastrissamine (jaspine B) and diastereoisomeric jaspines. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 235-241.
29. Sudhakar, N.; Kumar, A. R.; Prabhakar, A.; Jagadeesh, B.; Rao, B. V. The first synthesis of the anhydrophytosphingosine pachastrissamine (jaspine B) from Garner's aldehyde. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 325-327.
30. Passiniemi, M.; Koskinen, A. M. P. Asymmetric synthesis of Pachastrissamine (Jaspine B) and its diastereomers via $[\eta]3$ -allylpalladium intermediates. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 1774-1783.
31. Passiniemi, M.; Koskinen, A. M. P. Stereoselective total synthesis of pachastrissamine (jaspine B). *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 980-983.
32. Inuki, S.; Yoshimitsu, Y.; Oishi, S.; Fujii, N.; Ohno, H. Ring-Construction/Stereoselective Functionalization Cascade: Total Synthesis of Pachastrissamine (Jaspine B) through Palladium-Catalyzed Bis-cyclization of Bromoallenes. *Org. Lett.* **2009**, 11, 4478-4481.

33. Inuki, S.; Yoshimitsu, Y.; Oishi, S.; Fujii, N.; Ohno, H. Ring-Construction/Stereoselective Functionalization Cascade: Total Synthesis of Pachastrissamine (Jaspine B) through Palladium-Catalyzed Bis-cyclization of Propargyl Chlorides and Carbonates. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 3831-3842.
34. Yoshimitsu, Y.; Inuki, S.; Oishi, S.; Fujii, N.; Ohno, H. Stereoselective Divergent Synthesis of Four Diastereomers of Pachastrissamine (Jaspine B). *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 3843-3846.
35. Yoshimitsu, Y.; Miyagaki, J.; Oishi, S.; Fujii, N.; Ohno, H. Synthesis of pachastrissamine (jaspine B) and its derivatives by the late-stage introduction of the C-2 alkyl side-chains using olefin cross metathesis. *Tetrahedron* **2013**, 69, 4211-4220.
36. Ghosal, P.; Ajay, S.; Meena, S.; Sinha, S.; Shaw, A. K. Stereoselective total synthesis of Jaspine B (Pachastrissamine) utilizing iodocyclization and an investigation of its cytotoxic activity. *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, 24, 903-908.
37. Jana, A. K.; Panda, G. Stereoselective synthesis of Jaspine B and its C2 epimer from Garner aldehyde. *RSC Adv.* **2013**, 3, 16795-16801.
38. Prasad, K. R.; Chandrakumar, A. Stereoselective Synthesis of Cytotoxic Anhydrophytosphingosine Pachastrissamine [Jaspine B]. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 6312-6315.
39. Ichikawa, Y.; Matsunaga, K.; Masuda, T.; Kotsuki, H.; Nakano, K. Stereocontrolled synthesis of cytotoxic anhydrosphingosine pachastrissamine by using [3,3] sigmatropic rearrangement of allyl cyanate. *Tetrahedron* **2008**, 64, 11313-11318.
40. Martinková, M.; Mezeiová, E.; Fabišíková, M.; Gonda, J.; Pilátová, M.; Mojžiš, J. Total synthesis of pachastrissamine together with its 4-epi-congener via [3,3]-sigmatropic rearrangements and antiproliferative/cytotoxic evaluation. *Carbohydr. Res.* **2015**, 402, 6-24.
41. Du, Y.; Liu, J.; Linhardt, R. J. Stereoselective Synthesis of Cytotoxic Anhydrophytosphingosine Pachastrissamine (Jaspine B) from d-Xylose. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 1251-1253.
42. Liu, J.; Du, Y.; Dong, X.; Meng, S.; Xiao, J.; Cheng, L. Stereoselective synthesis of jaspine B from d-xylose. *Carbohydr. Res.* **2006**, 341, 2653-2657.
43. Zhao, M.-L.; Zhang, E.; Gao, J.; Zhang, Z.; Zhao, Y.-T.; Qu, W.; Liu, H.-M. An efficient and convenient formal synthesis of Jaspine B from d-xylose. *Carbohydr. Res.* **2012**, 351, 126-129.
44. Ramana, C. V.; Giri, A. G.; Suryawanshi, S. B.; Gonnade, R. G. Total synthesis of pachastrissamine (jaspine B) enantiomers from D-glucose. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 265-268.
45. Schmiedel, V. M.; Stefani, S.; Reissig, H.-U. Stereodivergent synthesis of jaspine B and its isomers using a carbohydrate-derived alkoxyallene as C3-building block. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, 9, 2564-2569.
46. Srinivas Rao, G.; Venkateswara Rao, B. A common strategy for the stereoselective synthesis of anhydrophytosphingosine pachastrissamine (jaspine B) and N,O,O,O-tetra-acetyl D-lyxophytosphingosine. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 6076-6079.
47. Abushanab, E.; Bessodes, M.; Antonakis, K. Practical enantiospecific syntheses of (+) erythro-9- (2s-hydroxy-3r-nonyl) adenine. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 3841-3844.
48. Chattopadhyay, A.; Mamdapur, V. R. (R)-2,3-O-Cyclohexylideneglyceraldehyde, a Versatile Intermediate for Asymmetric Synthesis of Chiral Alcohol. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 585-587.
49. Vichare, P.; Chattopadhyay, A. Nitrolaldol reaction of (R)-2,3-cyclohexylideneglyceraldehyde: a simple and stereoselective synthesis of the cytotoxic Pachastrissamine (Jaspine B). *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, 21, 1983-1987.

50. Reddy, L. V. R.; Reddy, P. V.; Shaw, A. K. An expedient route for the practical synthesis of pachastrissamine (jaspine B) starting from 3,4,6-tri-*O*-benzyl-d-galactal. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, 18, 542-546.
51. Ribes, C.; Falomir, E.; Carda, M.; Marco, J. A. Stereoselective synthesis of pachastrissamine (jaspine B). *Tetrahedron* **2006**, 62, 5421-5425.
52. Yakura, T.; Sato, S.; Yoshimoto, Y. Enantioselective Synthesis of Pachastrissamine (Jaspine B) Using Dirhodium(II)-Catalyzed C-H Amination and Asymmetric Dihydroxylation as Key Steps. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, 55, 1284-1286.
53. Cordero, F. M.; Gensini, M.; Goti, A.; Brandi, A. Stereoselective Approach to Hydroxyindolizidines: Protection/Deprotection of the Nitrone Functionality via Cycloaddition/Retrocycloaddition. *Org. Lett.* **2000**, 2, 2475-2477.
54. Abraham, E.; Candela-Lena, J. I.; Davies, S. G.; Georgiou, M.; Nicholson, R. L.; Roberts, P. M.; Russell, A. J.; Sánchez-Fernández, E. M.; Smith, A. D.; Thomson, J. E. Asymmetric synthesis of *N,O,O,O*-tetra-acetyl *D*-lyxo-phytosphingosine, jaspine B (pachastrissamine) and its C(2)-epimer. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, 18, 2510-2513.
55. Hayes, M. P.; Hatala, P. J.; Sherer, B. A.; Tong, X.; Zanatta, N.; Borer, P. N.; Kallmerten, J. Regioselective synthesis of ¹³C1-labeled 2-deoxyribonolactones. *Tetrahedron* **2001**, 57, 1515-1524.
56. Urano, H.; Enomoto, M.; Kuwahara, S. Enantioselective Syntheses of Pachastrissamine and Jaspine A via Hydroxylactonization of a Chiral Epoxy Ester. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2010**, 74, 152-157.
57. Marshall, J. A.; Garofalo, A. W. Synthesis of Chiral α,δ -Dioxygenated Allylic Stannanes as Reagents for Carbohydrate Synthesis and Homologation. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 8732-8738.
58. Venkatesan, K.; Srinivasan, K. V. A novel stereoselective synthesis of pachastrissamine (jaspine B) starting from 1-pentadecanol. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, 19, 209-215.
59. Enders, D.; Terteryan, V.; Palecek, J. í. Asymmetric Synthesis of Jaspine B (Pachastrissamine) via an Organocatalytic Aldol Reaction as Key Step. *Synthesis* **2008**, 2008, 2278-2282.
60. Llaveria, J.; Díaz, Y.; Matheu, M. I.; Castellón, S. Enantioselective Synthesis of Jaspine B (Pachastrissamine) and Its C-2 and/or C-3 Epimers. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 2011, 1514-1519.
61. Dhand, V.; Chang, S.; Britton, R. Total Synthesis of the Cytotoxic Anhydrophytosphingosine Pachastrissamine (Jaspine B). *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 8208-8213.
62. Evans, D. A.; Siska, S. J.; Cee, V. J. Resurrecting the Cornforth Model for Carbonyl Addition: Studies on the Origin of 1,2-Asymmetric Induction in Enolate Additions to Heteroatom-Substituted Aldehydes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 1761-1765.
63. Cornforth, J. W.; Cornforth, R. H.; Mathew, K. K. 24. A general stereoselective synthesis of olefins. *J. Chem. Soc.* **1959**, 112-127.
64. Salma, Y.; Ballereau, S.; Maaliki, C.; Ladeira, S.; Andrieu-Abadie, N.; Genisson, Y. Flexible and enantioselective access to jaspine B and biologically active chain-modified analogues thereof. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 3227-3243.
65. Génisson, Y.; Lamandé, L.; Salma, Y.; Andrieu-Abadie, N.; André, C.; Baltas, M. Enantioselective access to a versatile 4-oxazolidinonecarbaldehyde and application to the synthesis of a cytotoxic jaspine B truncated analogue. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, 18, 857-864.
66. Baudin, J. B.; Hareau, G.; Julia, S. A.; Ruel, O. A direct synthesis of olefins by reaction of carbonyl compounds with lithio derivatives of 2-[alkyl- or (2'-alkenyl)- or benzyl-sulfonyl]-benzothiazoles. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 1175-1178.

67. Bourdon, B.; Corbet, M.; Fontaine, P.; Goekjian, P. G.; Gueyrard, D. Synthesis of enol ethers from lactones using modified Julia olefination reagents: application to the preparation of tri- and tetrasubstituted exoglycals. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 747-749.
68. Gueyrard, D.; Haddoub, R.; Salem, A.; Bacar, N. S.; Goekjian, P. G. Synthesis of Methylene Exoglycals Using a Modified Julia Olefination. *Synlett*, **2005**, 2005, 520-522.
69. Tomas, L.; Bourdon, B.; Caille, J. C.; Gueyrard, D.; Goekjian, P. G. A Concise and Efficient Synthesis of Spiroketal – Application to the Synthesis of SPIKET-P and a Spiroketal from Bactrocera Species. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 2013, 915-920.
70. Treibs, A.; Kreuzer, F.-H. meso-Substituierte Dipyrrolylmethane und -methene. *Liebigs Ann. Chem.* **1969**, 721, 116-120.
71. Ulrich, G.; Ziesel, R.; Harriman, A. The Chemistry of Fluorescent Bodipy Dyes: Versatility Unsurpassed. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 1184-1201.
72. Loudet, A.; Burgess, K. BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 4891-4932.
73. Yang, L. J.; Simionescu, R.; Lough, A.; Yan, H. B. Some observations relating to the stability of the BODIPY fluorophore under acidic and basic conditions. *Dyes Pigments* **2011**, 91, 264-267.
74. Alford, R.; Simpson, H., M.; Duberman, J.; Hill, G. C.; Ogawa, M.; Regino, C.; Kobayashi, H.; Choyke, P. L. Toxicity of Organic Fluorophores Used in Molecular Imaging: Literature Review. *Mol. Imaging* **2009**, 8, 341-354.
75. Karolin, J.; Johansson, L. B. A.; Strandberg, L.; Ny, T. Fluorescence and Absorption Spectroscopic Properties of Dipyrrometheneboron Difluoride (BODIPY) Derivatives in Liquids, Lipid Membranes, and Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7801-7806.
76. Wagner, R. W.; Lindsey, J. S. Boron-dipyrromethenedyes for incorporation in synthetic multipigment light-harvesting assays. *Pure Appl. Chem.* **1996**, 68, 1373-1380.
77. Hensle, E. M.; Esfandiari, N. M.; Lim, S.-G.; Blum, S. A. BODIPY Fluorophore Toolkit for Probing Chemical Reactivity and for Tagging Reactive Functional Groups. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 2014, 3347-3354.
78. Al-Sheikh Ali, A.; Cipot-Wechsler, J.; Cameron, T. S.; Thompson, A. Formation of Vinylic Dipyrroles by the Deprotonation of meso-Alkyl and meso-Benzyl Dipyrroin HCl Salts. *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 2866-2869.
79. Peters, C.; Billich, A.; Ghobrial, M.; Högenauer, K.; Ullrich, T.; Nussbaumer, P. Synthesis of Borondipyrromethene (BODIPY)-Labeled Sphingosine Derivatives by Cross-metathesis Reaction. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 1842-1845.
80. Li, Z.; Mintzer, E.; Bittman, R. First Synthesis of Free Cholesterol-BODIPY Conjugates. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 1718-1721.
81. West, R.; Panagabko, C.; Atkinson, J. Synthesis and Characterization of BODIPY- α -Tocopherol: A Fluorescent Form of Vitamin E. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 2883-2892.
82. Fürstner, A.; Grabowski, J.; Lehmann, C. W. Total Synthesis and Structural Refinement of the Cyclic Tripyrrole Pigment Nonylprodigiosin. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 8275-8280.
83. Wu, L.; Burgess, K. A new synthesis of symmetric boraindacene (BODIPY) dyes. *Chem. Comm.* **2008**, 4933-4935.
84. Hostetler, E. D.; Fallis, S.; McCarthy, T. J.; Welch, M. J.; Katzenellenbogen, J. A. Improved Methods for the Synthesis of [ω - ^{11}C]Palmitic Acid. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 1348-1351.

85. Pérez, E. M.; Dryden, D. T. F.; Leigh, D. A.; Teobaldi, G.; Zerbetto, F. A Generic Basis for Some Simple Light-Operated Mechanical Molecular Machines. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 12210-12211.
86. Al-Dulayymi, J. a. R.; Baird, M. S.; Mohammed, H.; Roberts, E.; Clegg, W. The synthesis of one enantiomer of the α -methyl-trans-cyclopropane unit of mycolic acids. *Tetrahedron* **2006**, 62, 4851-4862.
87. Nielsen, M.; Jacobsen, C. B.; Paixão, M. W.; Holub, N.; Jørgensen, K. A. Asymmetric Organocatalytic Formal Alkynylation and Alkenylation of α,β -Unsaturated Aldehydes. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 10581-10586.
88. Tomas, L.; Boije af Gennäs, G.; Hiebel, M. A.; Hampson, P.; Gueyrard, D.; Pelotier, B.; Yli-Kauhialuoma, J.; Piva, O.; Lord, J. M.; Goekjian, P. G. Total Synthesis of Bistramide A and Its 36(Z) Isomers: Differential Effect on Cell Division, Differentiation, and Apoptosis. *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 7452-7466.
89. Pospíšil, J.; Sato, H. Practical Synthesis of β -Acyl and β -Alkoxy carbonyl Heterocyclic Sulfones. *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 2269-2272.
90. Watts, J.; Benn, A.; Flinn, N.; Monk, T.; Ramjee, M.; Ray, P.; Wang, Y.; Quibell, M. Functionalised 2,3-dimethyl-3-aminotetrahydrofuran-4-one and N-(3-oxo-hexahydrocyclopenta[b]furan-3a-yl)acylamide based scaffolds: synthesis and cysteinyl proteinase inhibition. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 2903-2925.
91. Mishra, A.; Behera, R. K.; Behera, P. K.; Mishra, B. K.; Behera, G. B. Cyanines during the 1990s: A Review. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 1973-2012.
92. Bhushan, K. R.; Liu, F.; Misra, P.; Frangioni, J. V. Microwave-assisted synthesis of near-infrared fluorescent sphingosine derivatives. *Chem. Comm.* **2008**, 4419-4421.
93. Obaya, N.; Payraastre, C.; Madaule, Y. Synthesis of new pentacarbon chain streptocyanines (pentamethinium salts). *Tetrahedron*, **2001**, 57, 9137-9147.
94. Izquierdo, A.; Guieu, V.; Gornitzka, H.; Madaule, Y.; Payraastre, C. Synthesis and Reactivity of a New Nonacarbon Chain Carboxonium Salt – Access to a New Class of Streptocyanine Dyes. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 2004, 2317-2320.
95. Guieu, V.; Izquierdo, A.; Garcia-Alonso, S.; André, C.; Madaule, Y.; Payraastre, C. Fluorescent Streptocyanine Dyes: Synthesis and Photophysical Properties – Synthesis of a New Hemicarboxonium Salt. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 2007, 804-810.

Chapitre IV – Synthèse d'iminosucres

I.	Introduction.....	229
II.	Synthèse du ligand L127.....	229
1)	Stratégie de synthèse.....	229
2)	Synthèse du composé.....	230
a)	Formation de la (Z)-diazocétone α,β -insaturée.....	230
b)	Formation de la dihydropyridinone.....	232
c)	Fonctionnalisation.....	232
III.	Synthèse du ligand L125.....	234
1)	Première voie de synthèse.....	234
a)	Protection des <i>trans</i> -diols vicinaux de la trihydroxypipéridine (257a).....	234
b)	Protection des <i>trans</i> -diols vicinaux des trihydroxypipéridines (258) et (264).....	235
c)	Calculs DFT.....	237
2)	Deuxième voie de synthèse.....	242
3)	Troisième voie de synthèse.....	247
4)	Dédoublage du mélange racémique.....	248
IV.	Conclusions et perspectives.....	249
1)	Conclusions.....	249
2)	Perspectives.....	251
	PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	253
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	266

I. Introduction

L'étude de modélisation moléculaire, présentée dans le Chapitre II, a conduit à la conception *in silico* de plusieurs iminosucres analogues du céramide. Ces ligands potentiels du domaine START de CERT, de type azépane ou pipéridines, sont représentés dans la Figure 1 ci-dessous.

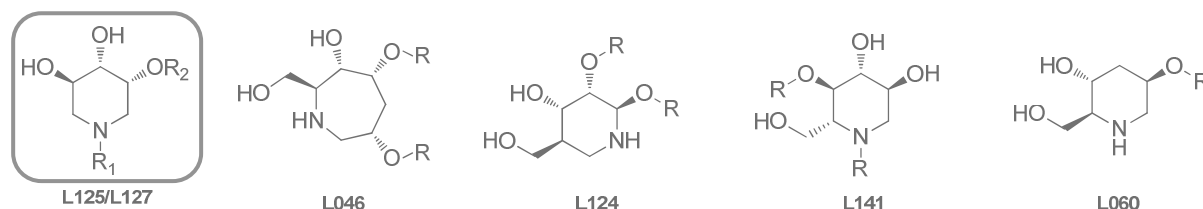


Figure 1 - Iminosucres conçus par modélisation moléculaire

Ce chapitre abordera principalement la synthèse des pipéridines trihydroxylées L125 ($R_1=R_2=C_{12}H_{25}$) et L127 ($R_1=C_{12}H_{25}$ et $R_2=H$). Ces synthèses ont été réalisées en collaboration avec le Pr. Antonio Burtoloso (Institut de Chimie de São Carlos, Université de São Paulo, Brésil), à partir d'un intermédiaire dihydropyridin-3-one. Ce projet a donné lieu à un séjour de trois mois dans son laboratoire pour réaliser la synthèse de ces composés. Cette énone est obtenue par réaction d'Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) entre un diazophosphonate et un aldéhyde donnant l'intermédiaire diazocétone- α,β -insaturée de géométrie Z, puis une réaction d'insertion NH intramoléculaire. La fonctionnalisation de cet intermédiaire donne accès aux deux pipéridines ciblées.

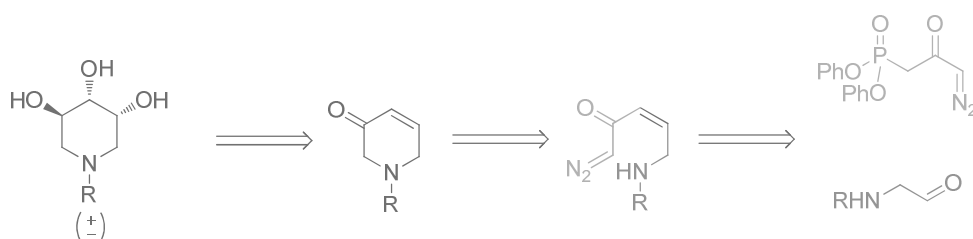


Schéma 1 - Stratégie de synthèse de pipéridines trihydroxylées par la méthode du Pr. A. Burtoloso

La synthèse des autres analogues qui n'a pas pu être réalisée au cours de la thèse sera abordée dans les perspectives du chapitre.

II. Synthèse du ligand L127

1) Stratégie de synthèse

Ce composé de symétrie C_2 , devrait être favorablement reconnu par la protéine grâce à un nombre réduit de complexes possibles ligand-protéine. C'est donc un composé d'intérêt pour l'évaluation *in vitro*. Afin de synthétiser ce composé, nous avons utilisé la méthode du Pr. A. Burtoloso pour former le motif pipéridine polyhydroxylée. Notre choix s'est porté sur une protection de l'amine N-Cbz permettant ainsi une insertion directe de la chaîne N-alkyle par amination réductrice. Les groupements hydroxyles sont introduits par réduction et dihydroxylation de l'intermédiaire dihydropyridinone, qui peut être synthétisé par insertion NH intramoléculaire à partir d'une (Z)-

diazocétone α,β -insaturée. Enfin, le motif (Z)-diazocétone- α,β -insaturée est obtenu par (Z)-oléfination de HWE à partir du diazophosphonate et du 2-aminoacétaldéhyde protégé (cf. Schéma 2).

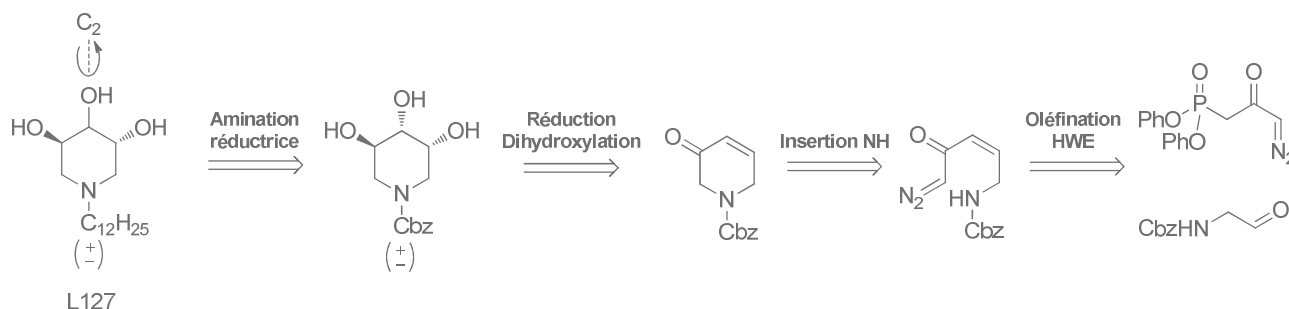


Schéma 2 - Analyse rétrosynthétique du ligand L127

2) Synthèse du composé

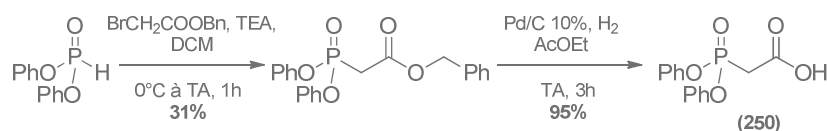
Préambule : l'ensemble des étapes de synthèse jusqu'à la trihydroxypipéridine N-protégée ont été réalisées et optimisées avant mes travaux dans le laboratoire du Pr. A. Burtoloso (Institut de Chimie de São Carlos, Université de São Paulo, Brésil) sur le composé N-Ts. Pour le composé N-Cbz, la synthèse a été menée jusqu'à l'intermédiaire dihydropyridinone.¹ La majorité des étapes de synthèse de ce composé a donc été optimisée au laboratoire du Pr. A. Burtoloso.

a) Formation de la (Z)-diazocétone α,β -insaturée

La première partie de la synthèse consiste à former le motif (Z)-diazocétone- α,β -insaturée à partir du diazophosphonate et de l'aldéhyde. La synthèse a ainsi débuté par la préparation de ces deux intermédiaires, puis leur mise en réaction dans l'oléfination d'Horner-Wadworth-Emmons.

Synthèse du diazophosphonate

Dans un premier temps, la diphenylphosphite commerciale est engagée dans une réaction de Michaelis-Becker avec le benzylbromoacétate dans les conditions décrites par K. Ando² pour fournir la diphenylphosphorylacétate de benzyle. Bien que le rendement de cette réaction soit faible, cette méthode présente l'avantage d'utiliser des précurseurs commerciaux et non toxiques contrairement aux autres méthodes d'obtention de ce type de composés.^{2, 3} Afin d'éviter l'hydrolyse de l'ester de phosphonate, l'hydrogénolyse est privilégiée à la saponification pour obtenir l'acide (**250**).

Schéma 3 - Synthèse de l'acide (**250**)

L'acide (**250**) est ensuite activé en présence de chlorure d'oxalyle, puis additionné à une solution de diazométhane pour fournir le diazophosphonate (**251**) dans les conditions décrites par Pr. A. Burtoloso¹ avec un rendement global de 20% sur trois étapes.

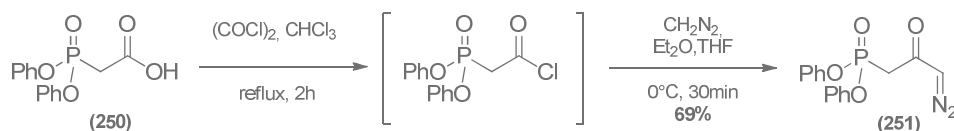


Schéma 4 - Synthèse du diazophosphonate (251)

Synthèse de l'aldéhyde

En parallèle, l'éthanolamine commerciale est préalablement *N*-protégée par un groupement carboxybenzyle (Cbz) selon la procédure d'I. Izzo et F. D. Ricardis.⁴ L'alcool (**252**) est ensuite oxydé en présence d'acide 2-iodoxybenzoïque (IBX)⁵ pour fournir l'aldéhyde (**253**). Les rendements obtenus sont comparables avec ceux de la littérature.

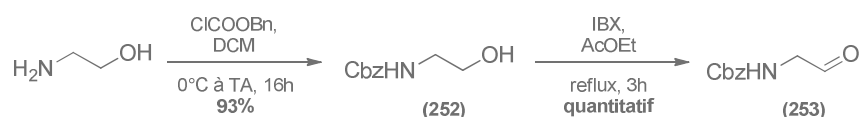
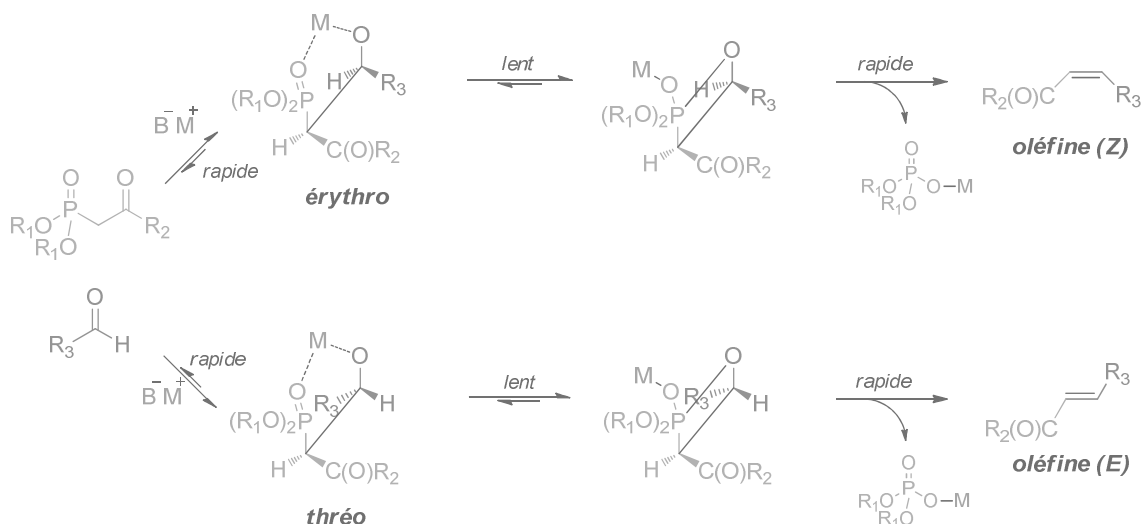


Schéma 5 - Synthèse de l'aldéhyde (253)

Oléfination d'Horner-Wadworth-Emmons

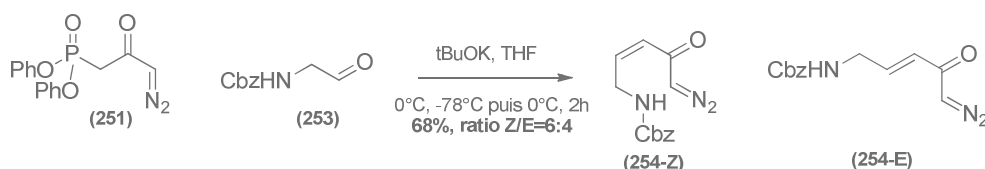
La réaction de HWE, adaptée de la réaction de Wittig, est une méthode courante pour préparer des esters α,β -insaturés. L'anion phosphonate nucléophile réagit avec un composé carbonyle pour donner un alcène et un ester d'acide phosphorique. La stéréosélectivité de la réaction est basée à la fois sur le contrôle thermodynamique et cinétique de la formation des adduits de configuration *threo* et *erythro* et de leur décomposition en oléfines. La géométrie de l'oléfine sera déterminée par la stéréosélectivité et la réversibilité de l'étape initiale de formation de la liaison C-C conduisant aux adduits intermédiaires. Généralement, la réaction favorise l'oléfine (*E*), plus stable thermodynamiquement. Différentes conditions, telles que le choix du cation (M^+), la température, le solvant et la nature du réactif phosphonate (substituants R_1 sur le Schéma 6), ont été étudiées par W. Still et C. Gennari,⁶ ainsi que K. Ando,^{2,3,7-9} pour favoriser la formation de (*Z*)-esters α,β -insaturés.

Schéma 6 - Mécanisme de la réaction HWE, adapté de K. Ando⁷

Dans le cas de réaction avec un dialkylphosphonoacétate (R_1 =alkyl), la formation de l'adduit *threo* plus stable thermodynamiquement serait favorisée, aboutissant à la formation de l'oléfine *trans*. En revanche, dans le cas de réaction avec des phosphonoacétate de type Still-Gennari et Ando (R_1 =

CF₃CH₂- ou Ph-), une (*Z*)-sélectivité est observée. Deux facteurs pourraient être à l'origine de cette sélectivité. D'une part, la formation de l'adduit *erythro* serait privilégiée cinétiquement par une gêne stérique entre les groupements R₁ encombrants et R₃. D'autre part, cet adduit *erythro* serait formé de façon irréversible. Les substituants R₁ électro-attracteurs des phosphonoacétates de type Still-Gennari et Ando (pKa PhOH = 10.0, pKa CF₃CH₂OH = 12.4, pKa CH₃CH₂OH = 16) exacerbent le caractère électrophile du phosphore de l'adduit à cinq centres, augmentant ainsi sa réactivité. La formation de l'adduit à quatre centres serait alors privilégiée à la décomposition de l'adduit à cinq centres en produit de départ, expliquant la formation prédominante d'oléfine *cis*.

Ainsi, le diazophosphonate (**251**) de type Ando est mis en réaction avec l'aldéhyde (**253**) en présence de *tert*-butylate de potassium à -78°C pour fournir un mélange de γ -aminodiazocétone- α,β -insaturées (**254**) avec un rendement de 68% et une sélectivité *Z/E* de 6:4. Ce rendement et cette sélectivité sont légèrement plus faibles que ceux décrits dans la littérature,¹ probablement dû à une montée en échelle d'un facteur 10.

Schéma 7 - Synthèse de la diazocétone α,β -insaturée (**254**)

b) Formation de la dihydropyridinone

La γ -aminodiazocétone- α,β -insaturée (**254-Z**) possède la géométrie appropriée pour la formation d'un hétérocycle azoté par réaction d'insertion N-H intramoléculaire par catalyse métallique. Ainsi, la mise en réaction de (**254-Z**) dans les conditions optimisées du Pr. A. Burtoloso¹ permet d'accéder à la dihydropyridinone (**255**) avec un rendement de 55% en évitant les réactions secondaires d'insertion C-H et de cyclopropanation.¹⁰

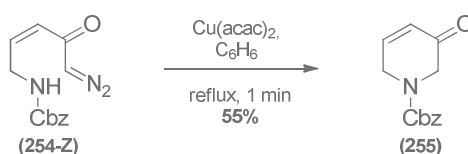
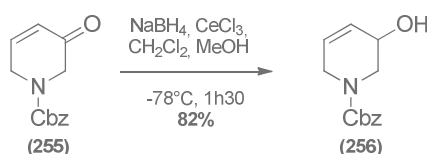


Schéma 8 - Synthèse de la dihydropyridinone

c) Fonctionnalisation

Afin d'accéder au composé cible, trois étapes de fonctionnalisation de la brique dihydropyridinone (**255**) sont nécessaires. Dans un premier temps, la réduction de (**255**) dans les conditions de Luche permet d'accéder à un mélange racémique de l'hydroxydihydropyridine (**256**) avec un rendement de 82%, comparable au rendement avec le composé *N*-Ts.¹

Schéma 9 - Synthèse de l'hydroxydihydropyridine (**256**)

L'hydroxydihydropyridine (**256**) est ensuite engagée dans une *cis*-dihydroxylation sélective catalysée au OsO_4 ¹¹ pour donner un mélange racémique de la trihydroxypipéridine (**257a**) avec un rendement de 78% comparable à celui obtenu avec le composé *N*-Ts.¹

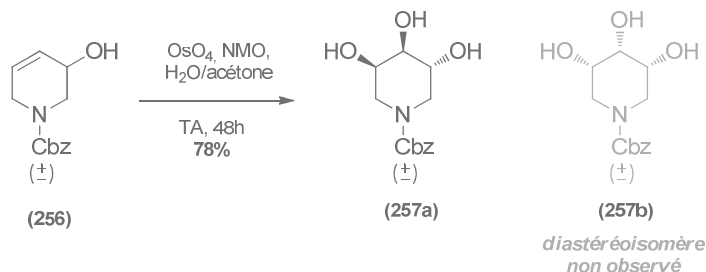


Schéma 10 - Synthèse de la trihydroxypipéridine (**257a**)

De la même façon que pour le composé *N*-Ts, un seul diastéréoisomère a été obtenu. Deux rotamères du carbamate (**257a**) sont observables en RMN se traduisant par des signaux mal définis en RMN ^1H et un dédoublement des signaux en RMN ^{13}C . La confirmation de la forme diastéréoisomère (**257a**) et non (**257b**) est difficile à ce stade malgré les expériences 2D en RMN à cause de la mauvaise définition des signaux due à la forte flexibilité conformationnelle du composé.

Enfin, l'amination réductrice de la pipéridine *N*-Cbz (**257**) dans des conditions similaires à J. Joglar et P. Clapés¹² en présence de dodécanal a permis d'accéder à la dodécylpipéridine trihydroxylée (**258**) ciblée avec un rendement de 74%.

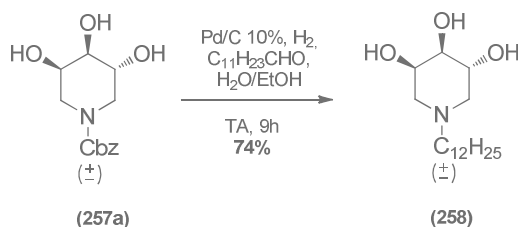


Schéma 11 - Synthèse de la pipéridine L127 ciblée (**258**)

Les signaux RMN de ce composé sont bien résolus, permettant une analyse détaillée des constantes de couplage. Les constantes de couplage J_{3-4}^3 et J_{4-5}^3 sont respectivement de 3.0Hz et 7.5Hz. D'après la courbe de Karplus, les angles dièdres correspondant indiquent une configuration *cis* des protons $\text{H}_3\text{-H}_4$, et une configuration *trans* des protons $\text{H}_4\text{-H}_5$ (cf. Tableau 1). Ces résultats confirment ainsi la formation d'un seul diastéréoisomère lors de la dihydroxylation.

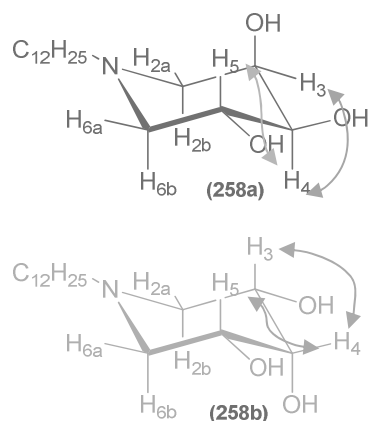


Tableau 1 - Attribution RMN du composé (258)

atome	δ (ppm)	J^3 (Hz)
H-2a	2.90-2.75	-
H-2b	2.35	-
H-3	3.92	$J^3_{3-2a}=5.7$ (trans) ; $J^3_{3-4}=J^3_{3-2b}=3.0$ (cis).
H-4	3.43	$J^3_{4-3}=3.0$ (cis) ; $J^3_{4-5}=7.5$ (trans).
H-5	3.82	$J^3_{5-6a}=3.9$ (cis) ; $J^3_{5-4}=J^3_{5-6b}=7.5$ (trans).
H-6a	2.90-2.75	-
H-6b	2.18	-

Le composé ciblé (**258**) (ou L127) a ainsi été synthétisé en sept étapes à partir de l'éthanolamine commerciale avec un rendement global de 10%. L'interaction de cette molécule avec le domaine START de CERT pourra être évaluée *in vitro*.

III. Synthèse du ligand L125

Afin d'accéder à la pipéridine L125 ciblée, plusieurs stratégies ont été envisagées à partir des intermédiaires de la synthèse précédente.

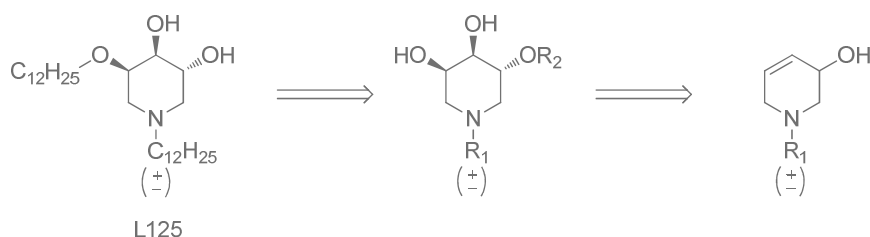


Schéma 12 – Analyse rétrosynthétique du ligand L125

1) Première voie de synthèse

a) Protection des *trans*-diols vicinaux de la trihydroxypipéridine (**257a**)

La première méthode utilisée pour accéder à l'analogue désiré consiste à insérer sélectivement une chaîne dodécyle en position 3 sur un pipéridine trihydroxylée. Pour cela, une protection des diols vicinaux en configuration *trans*, utilisée en chimie des sucres, a tout d'abord été envisagée.

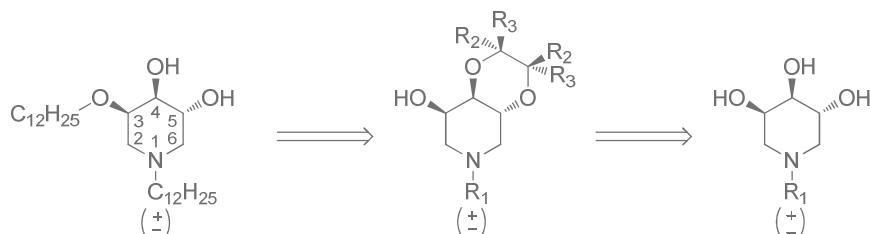


Schéma 13 - Première analyse rétrosynthétique de L125

Différentes méthodes de protection sélective de diols vicinaux *trans*-diéquatoriaux ont été développées au cours des dernières années. Cette sélectivité repose sur la formation de l'acétal présentant le moins de gêne stérique et un contrôle de la configuration par effet anomérique dans le

cas de carbohydrates. Ainsi, S.V. Ley et ses collaborateurs reportent au début des années 90, l'utilisation du 3,3',4,4'-tétra-hydro-6,6'-spirobi-2H-pyrane (bis-DHP) pour former sélectivement des dispiroacétals sur différents carbohydrates.¹³⁻¹⁵ Un an après, cette même équipe propose l'utilisation du 1,1,2,2-tétraméthoxycyclohexane (TMC) pour protéger sélectivement des carbohydrates par des cyclohexane-1,2-diacétals.^{16, 17} Bien que ces groupements, bis-DHP et TMC, soient très sélectifs dans la protection des 1,2-diols *trans*-diéquatoriaux, leur préparation reste coûteuse. L'utilisation du 2,2,3,3-tétraméthoxybutane (TMB), plus simple d'accès et moins coûteux, a été développée par J.W. Frost et ses collaborateurs comme alternative au bis-DHP et TMC pour la protection de diols vicinaux *trans*-diéquatoriaux en formant un butane-2,3-bisacétal (BBA)¹⁸. Cette méthode a par la suite été simplifiée par l'équipe de S. V. Ley.¹⁹ Cette simplification consiste à faire directement réagir la butane-2,3-dione, sur le 1,2-diol en présence de triméthylorthoformate et d'une quantité catalytique d'acide (acide camphresulfonique (CSA) ou $(\text{BF}_3\text{OEt}_2)$), permettant la formation « one pot » du BBA. Ce dernier protocole a ainsi été appliqué sur la pipéridine (**257a**).

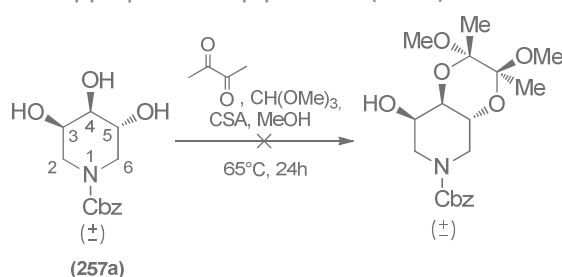


Schéma 14 - Protection de (**257a**) par la formation d'un butane-2,3-bisacétal (BBA)

Aucune conversion de (**257a**) n'a été observée lorsque celui-ci est mis en réaction avec la butane-2,3-dione, le triméthylorthoformate et une quantité catalytique de BF_3OEt_2 dans le méthanol à température ambiante ou à reflux. Il en est de même en utilisant le CSA à la place du BF_3OEt_2 dans le méthanol à reflux, malgré des temps de réaction prolongés jusqu'à 72 heures.

Le BBA de (**257a**) a donc été impossible à obtenir alors que nous avons pu protéger l'ester de l'acide quinique dans les mêmes conditions avec un rendement de 68% après recristallisation, comme décrit dans la littérature.²⁰

Cette absence de réactivité de (**257a**) pour former l'acétal pourrait être due à une prédominance du conformère *trans*-diaxial (à droite sur le Schéma 15), la protection ne pouvant se faire que sur des diols vicinaux *trans*-diéquatoriaux (à gauche sur le Schéma 15).

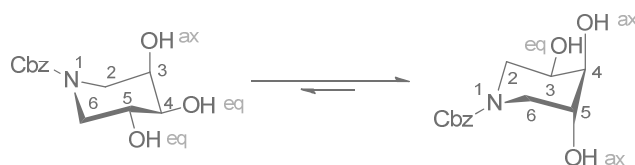


Schéma 15 - Hypothèse d'équilibre des conformères de (**257a**)

b) Protection des *trans*-diols vicinaux des trihydroxypipéridines (**258**) et (**264**)

Afin de pallier ce problème, la protection a été réalisée sur d'autres pipéridines trihydroxylée *N*-substituée. Cet autre substituant pourrait alors favoriser le conformère *trans*-diéquatorial au conformère *trans*-diaxial.

Ainsi, dans un premier temps, la pipéridine (**258**) a été engagée dans la réaction de formation du BBA dans des conditions similaires à celles décrites par S. V. Ley et ses collaborateurs.¹⁹ Seule la quantité

de CSA a été augmentée de 0.2 équivalent à 1.2 équivalents pour tenir compte de la présence de l'azote protonable de l'amine (**258**). Aucune conversion n'a été observée après 72 heures de reflux, probablement à cause d'un positionnement axial des diols *trans*-vicinaux.

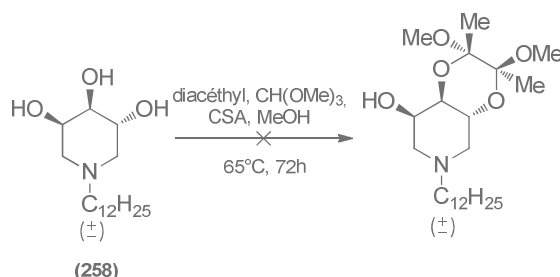


Schéma 16 - Protection de (**258**) par la formation d'un butane-2,3-bisacétal (BBA)

Enfin, la formation d'un BBA a été envisagée sur la *N*-tosylpipéridine trihydroxylée (**264**). Bien que le groupement tosyle ajoute une étape supplémentaire de déprotection pour insérer la chaîne *N*-alkyle dans la synthèse du composé cible, ce composé présente l'avantage d'avoir déjà été synthétisé au laboratoire du Pr. A. Burtoloso avec des rendements convenables et une bonne sélectivité Z/E lors de l'oléfination d'HWE.¹

Ainsi, d'après le protocole du Pr. A. Burtoloso, la synthèse de (**264**) a débuté par la mono-protection de l'éthanolamine avec un groupement tosyle dans des conditions classiques de *N*-tosylation. L'alcool (**259**) en ensuite oxydé en présence d'IBX pour fournir l'aldéhyde (**260**).

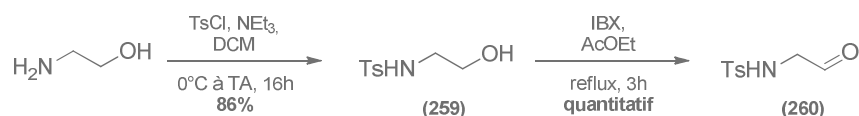


Schéma 17 - Synthèse de l'aldéhyde (**260**)

L'aldéhyde (**260**) est ensuite engagée dans une oléfination d'HWE avec le diazophosphonate (**251**) pour fournir un mélange de γ -aminodiazocétone- α,β -insaturées (**261**) avec un rendement de 32% et une sélectivité Z/E de 6:4.

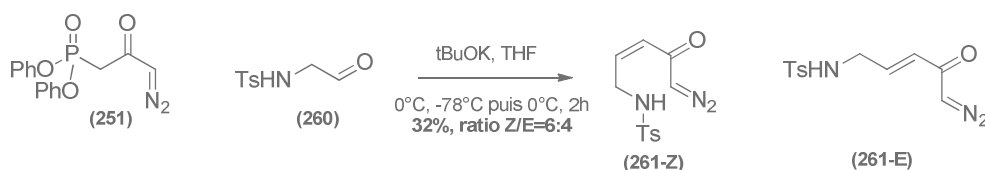
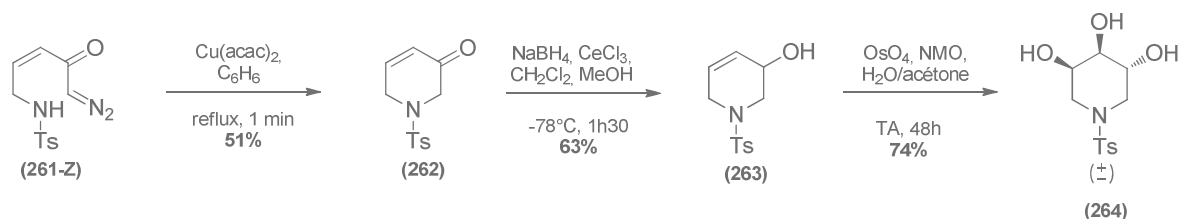


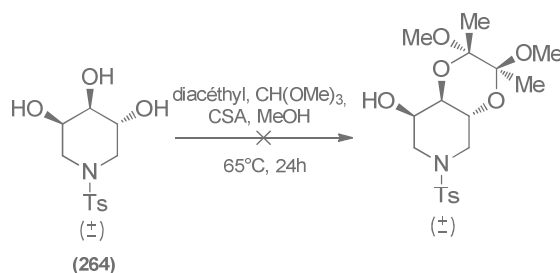
Schéma 18 - Synthèse de la diazocétone α,β -insaturée (**261**)

Le composé (**261-Z**) est mis en réaction d'insertion NH pour former la dihydropyridinone (**262**) avec un rendement de 51%. La réduction de (**262**) dans les conditions de Luche permet d'accéder à l'alcool (**263**) avec un rendement de 63%. La dihydroxylation sélective de (**263**) conduit à la *N*-tosylpipéridine trihydroxylée (**264**) avec un rendement de 74%.

Sur l'ensemble des étapes de cette synthèse, les rendements obtenus sont plus faibles que ceux annoncés dans la littérature,¹ mais non significatifs car les expériences n'ont été réalisées qu'une seule fois.

Schéma 19 - Synthèse de la *N*-tosylpipéridine trihydroxylée (**264**)

La pipéridine (**264**) a été engagée dans la réaction de formation du BBA dans les conditions de S. V. Ley et ses collaborateurs.¹⁹ Cette fois encore, aucune conversion n'a été observée après 48 heures de reflux, probablement encore à cause d'un positionnement 1,2-diaxial des diols *trans*-vicinaux.

Schéma 20 - Protection de (**264**) par la formation d'un butane-2,3-bisacétal (BBA)

c) Calculs DFT

Face aux échecs expérimentaux de protection du motif *trans*-1,2-diol des pipéridines trihydroxylées; l'ester quinique, la pipéridine (**257a**) et la pipéridine trihydroxylée NH_2^+ ont été modélisée sous Gaussian en utilisant la fonction de densité (DFT) au sein du laboratoire par le Dr. Christiane André-Barrès.

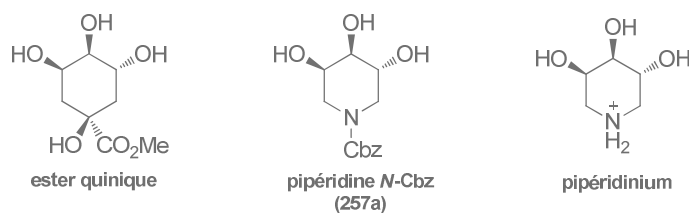


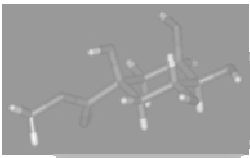
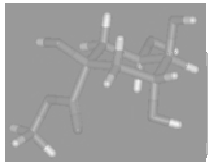
Figure 2 - Structures évaluées par DFT

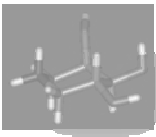
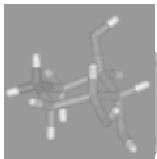
Quatre conformères, *c-1*, *c-2*, *c-3* et *c-4*, ont été sélectionnés pour la pipéridine (**257a**) après des calculs préliminaires en HF/STO-3, conformères pour lesquels les énergies relatives des minima ne variaient pas de plus de 3kcal/mol. Les géométries des conformères les plus stables sélectionnés, ainsi que les deux conformères, *ester-1* et *ester-2* de l'ester quinique, les deux conformères, *pipéridinium-1* et *pipéridinium-2* de la pipéridine trihydroxylée NH_2^+ ont été optimisées au niveau B3LYP 6-31+G(d,p) en phase gaz. Un calcul des fréquences à 298K sur les minima a permis de calculer l'énergie libre de Gibbs de chaque conformère. Enfin, la population de chaque composé a été évaluée par calcul de la distribution de Boltzmann, permettant ainsi d'estimer la proportion relative de chaque conformère :

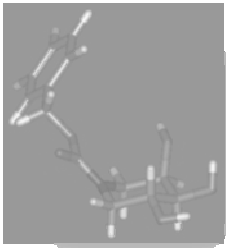
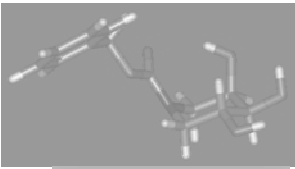
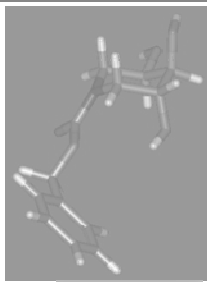
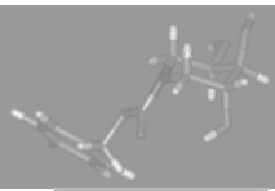
$$\frac{P_i}{P_j} = \exp\left(\frac{G_j - G_i}{k_B T}\right) \quad (eq.1)$$

L'ensemble des résultats est reporté dans le Tableau 2 suivant.

Tableau 2 - Géométrie et énergie de Gibbs des conformères de l'ester quinique, de la pipéridine NH_2^+ et *N*-Cbz au niveau B3LYP/6-31+G(d,p) dans le vide.

Ester quinique	ester-1	ester-2
		
G (298K)	-750.46830	-750.46086
ΔG (kcal)	0	+4.66
Distribution (%)	99.99	0.01
$d_{\text{O4-O5}}$ (Å)	2.78	-
Angle dièdre O4-C4-C5-O5 (°)	55.83	-

Pipéridinium	pipéridinium-1	pipéridinium-2
		
G (298K)	-477.81147	-477.81823
ΔG (kcal)	+4.24	0
Distribution (%)	0.08	99.92
$d_{\text{O4-O5}}$ (Å)	2.93	-
Angle dièdre O4-C4-C5-O5 (°)	66.42	-

Pipéridine (257a)	c-1	c-2	c-3	c-4
				
G (298K)	-936.31690	-936.31720	-936.31541	-936.31609
ΔG (kcal)	+0.19	0	+1.13	+0.70
Distribution (%)	33.25	45.83	6.82	14.10
$d_{\text{O4-O5}}$ (Å)	2.88	2.89	-	-
Angle dièdre O4-C4-C5-O5 (°)	62.30	63.45	-	-

L'analyse des résultats de modélisation de l'ester quinique indique que la conformation *trans*-diéquatorial serait la seule présente pour ce composé. Cette forme permet un positionnement optimal des groupements hydroxyles pour la protection par le BBA.

Les déplacements chimiques et constantes de couplage des *pipéridiniums 1 et 2* ont été calculés en B3LYP/6-31+G(d,p) en utilisant le modèle implicite de solvant (PCM, « polarizable continuum model ») pour le méthanol. Ce calcul a été effectué sur les géométries obtenues en B3LYP/6-31+G(d,p). Les spectres ont ensuite été simulés dans Mestre à partir des déplacements chimiques et des constantes de couplage calculés.

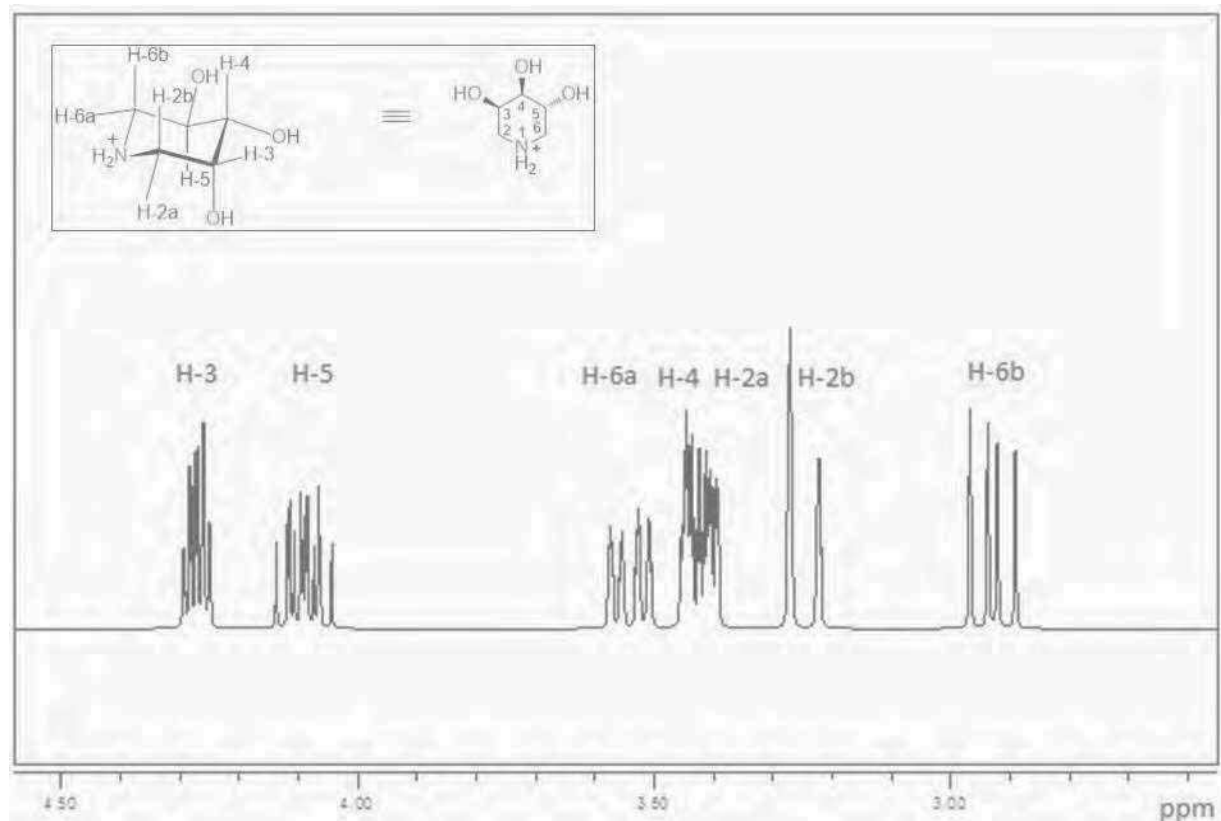


Figure 3 - Spectre RMN ^1H calculé (B3LYP/6-31+G(d,p)) du pipéridinium 1

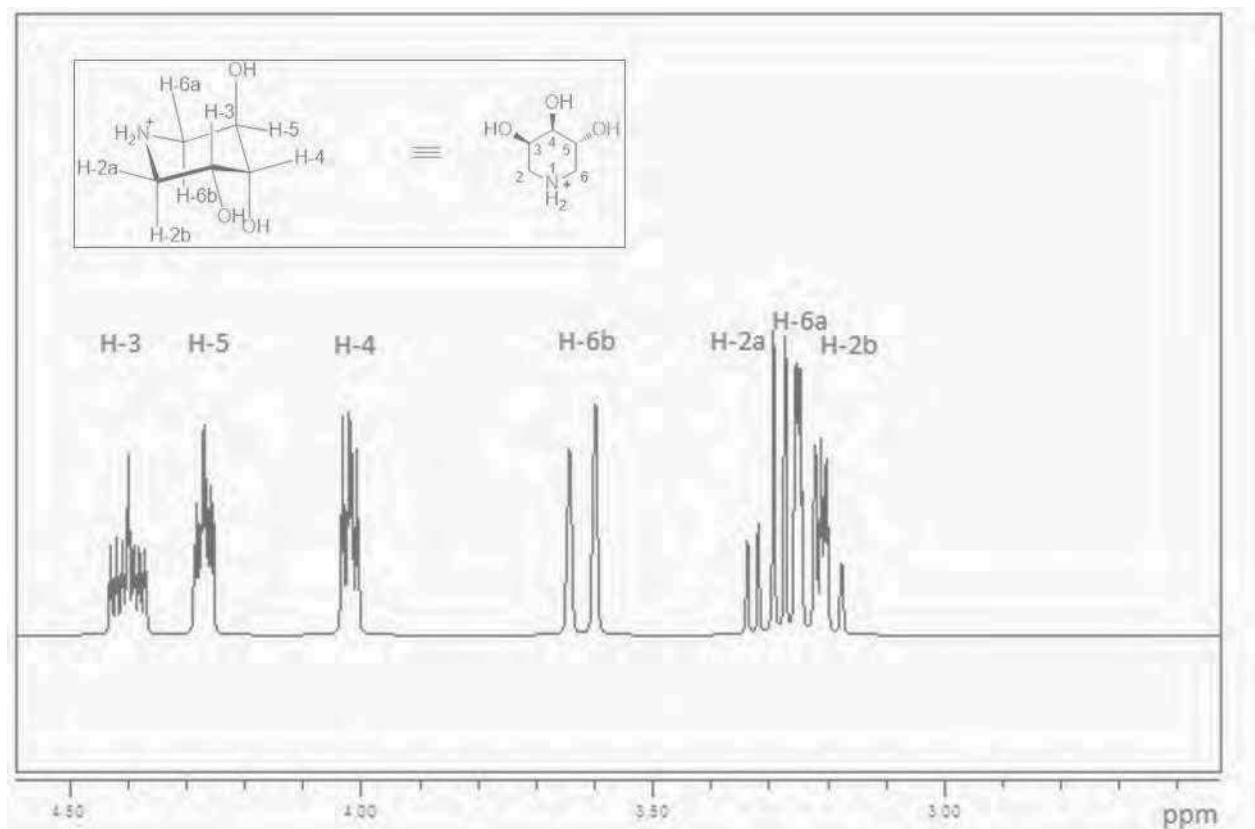


Figure 4 - Spectre RMN ^1H calculé (B3LYP/6-31+G(d,p)) du pipéridinium 2

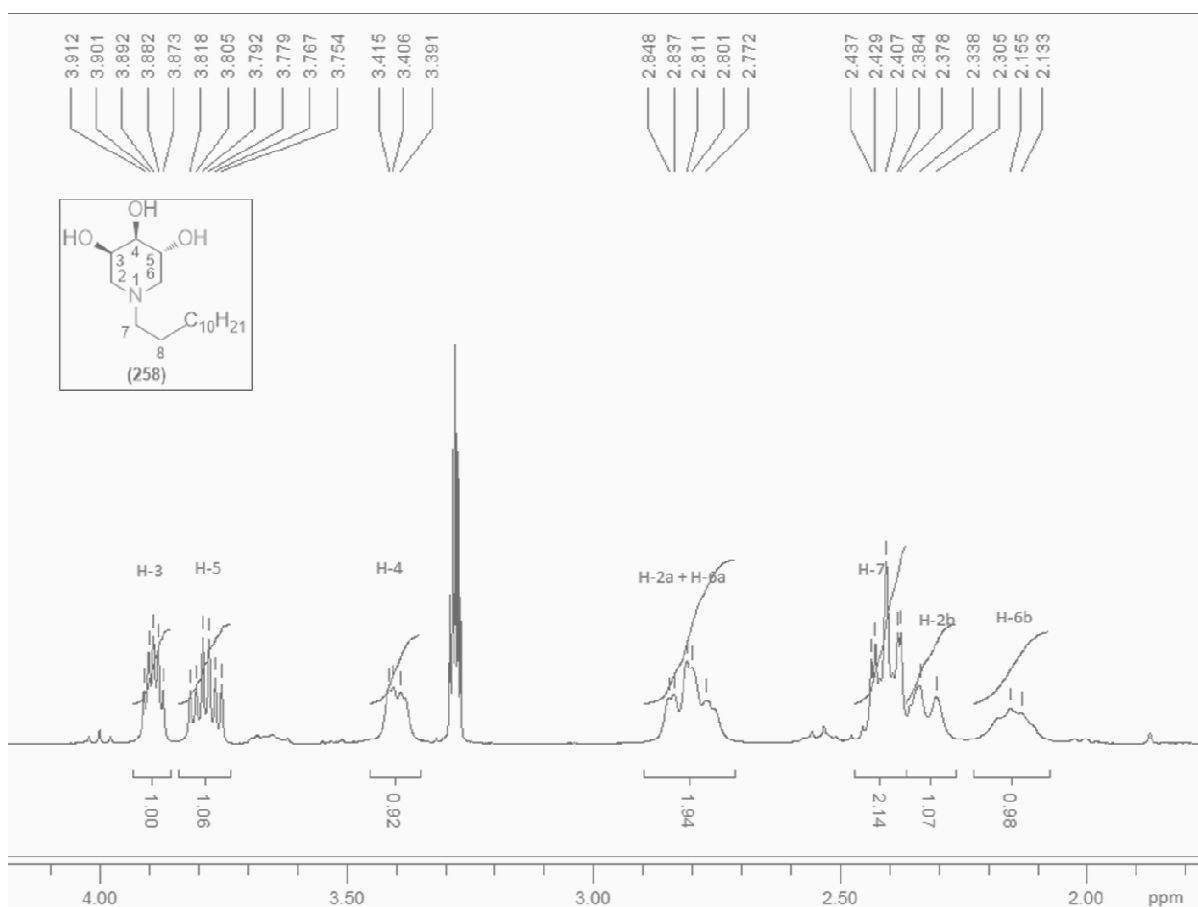


Figure 5 - Spectre RMN ^1H de la pipéridine (258), zoom entre 4 et 2 ppm

En revanche, le conformère *pipéridinium-2 trans*-diaxiale serait le seul existant, empêchant la formation de l'acétal. Les spectres RMN ^1H simulés du *pipéridinium-1* et du *pipéridinium-2* ont été comparés au spectre RMN ^1H de la *N*-dodécylpipéridine (**258**). Le spectre RMN ^1H du composé (**258**) est similaire au spectre simulé du *pipéridinium-2*, indiquant que celui-ci adopterait la même conformation que le *pipéridinium-2*, soit en *trans*-diaxiale. Cette conformation expliquerait l'impossibilité de protéger des diols vicinaux en position *trans* par un acétal.

Enfin, la structure du carbamate (**257a**) semble plus flexible que les autres pipéridines, notamment par les nombreuses formes rotamères du groupement Cbz. Les deux conformères *c-1* et *c-2*, *trans*-diéquatoriaux, seraient présents à 79% contre 21% pour les conformères *c-3* et *c-4* *trans*-diaxiaux. L'hypothèse d'un positionnement *trans*-diaxial des diols vicinaux n'explique pas à elle seule l'impossibilité de former l'acétal, puisque cette forme resterait minoritaire. Par contre, une différence est à noter entre les formes *trans*-diéquatoriales des pipéridines et de l'ester quinique. La distance entre O4 et O5 et l'angle dièdre O4-C4-C5-O5 sur l'*ester-1* sont de 2.78Å et 55.83° alors que ces valeurs sont plus élevées pour les pipéridines : 2.88Å et 62.30° pour la forme *c-1* et 2.89Å et 63.45° pour la forme *c-2*. Ces deux paramètres pourraient donc expliquer la différence de réactivité et de sélectivité de cette protection.

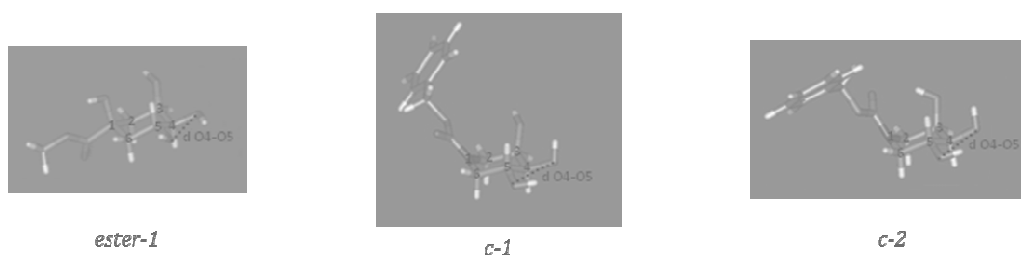


Figure 6 - Distances O4-O5 sur le conformère *ester-1* et sur les conformères *c-1* et *c-2* de la pipéridine (**257a**)

Ainsi, cette protection semble impossible sur les pipéridines soit à cause d'une forme *trans*-diaxiale prédominante, soit à cause d'une distance O4-O5 et d'un angle dièdre O4-C4-C5-O5 trop importants sur les formes *trans*-diéquatoriales. Le composé cible semble donc inaccessible par cette voie de synthèse.

2) Deuxième voie de synthèse

La deuxième méthode envisagée consiste à insérer sélectivement une chaîne dodécyle en position 3 par ouverture sélective d'un benzilidèneacétal.

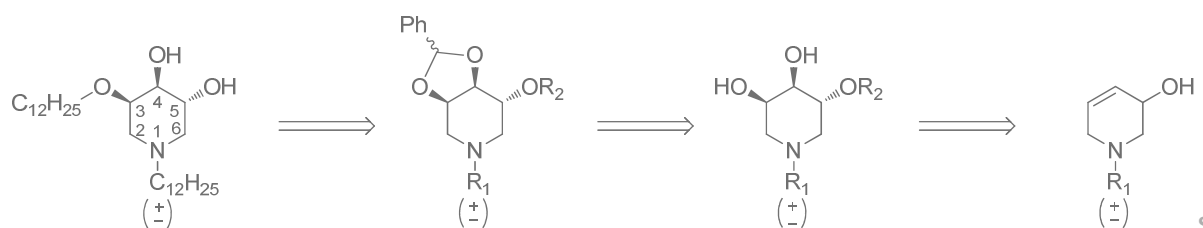
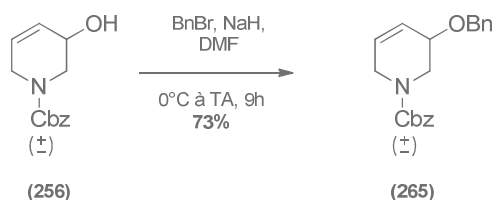


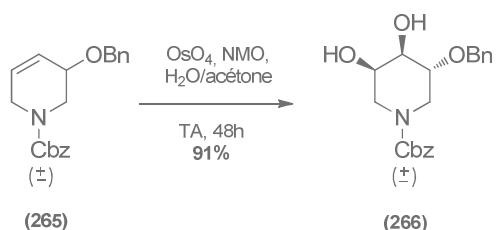
schéma 21 – Deuxième analyse rétrosynthétique de la trihydroxypipéridine *N,O*-alkyle

Formation du benzylidèneacétal

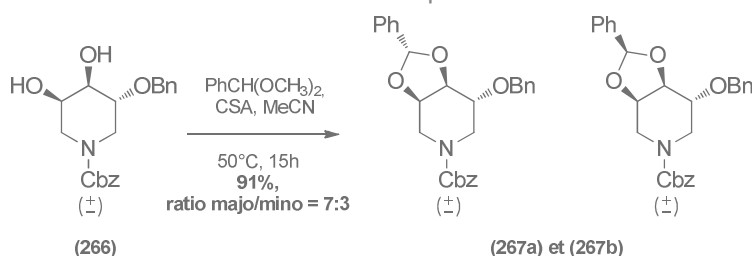
Avant la synthèse du benzylidèneacétal, l'intermédiaire racémique (**256**) est benzylé dans des conditions utilisées par A. Riera ²¹ pour fournir l'alcool benzylique (**265**) avec un rendement de 73%.

Schéma 22 - Synthèse de l'alcool benzylique (**265**)

La dihydroxylation sélective de (**265**) selon la procédure de D. Y. Cha ¹¹ donne accès la pipéridine (**266**) avec un rendement de 91%. Comme précédemment, un seul diastéréoisomère a été obtenu avec distinction de deux rotamères en RMN ¹H et ¹³C.

Schéma 23 - Synthèse de la pipéridine (**266**)

Enfin, la dihydroxypipéridine (**266**) a été engagée dans une réaction d'acétalisation avec le benzaldéhyde diméthylacétal en présence de CSA ²² pour fournir deux diastéréoisomères benzylidèneacétal (**267a**) et (**267b**) séparables par chromatographie. Les deux diastéréoisomères ont été obtenus avec un rendement de 91% et un ratio respectif de 3:7.

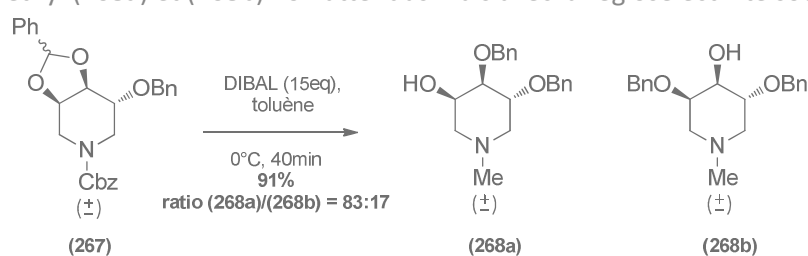
Schéma 24 - Synthèse du benzylidèneacétal (**267**)*Ouverture sélective du benzylidèneacétal*

L'ouverture du benzylidèneacétal (**267**) a ensuite été envisagée. Différentes conditions, majoritairement utilisées sur des carbohydrates, sont disponibles pour ouvrir régiosélectivement un benzylidèneacétal. Elles reposent sur l'utilisation d'un acide et d'un donneur d'hydrure. Le Tableau 3 ci-après, rassemble les systèmes les plus couramment utilisés. Le benzylidèneacétal est généralement réduit au niveau de l'oxygène le moins encombré, mais les effets électroniques des substituants adjacents et du solvant peuvent influencer la régiosélectivité.

Tableau 3 – Exemples de conditions classiques d'ouverture régiosélective de benzyldèneacétals

Donneur d'hydrure	NaBH ₃ CN	BH ₃ .THF	Me ₃ NBH ₃	Me ₂ NHBH ₃	Et ₃ SiH	Me ₂ EtSiH	LiAlH ₄	DIBAL
Acide								
HCl	X ²³⁻²⁵							
TFA					X ^{25, 26}			
TMSOTf		X ²³						
Bu ₂ BOTf		X ²⁵						
Cu(OTf) ₂		X ^{25, 27}	X ²⁵		X ²⁷	X ²⁵		
V(O)(OTf) ₂		X ²⁵						
AlCl ₃			X ²⁵				X ^{25, 28}	
BF ₃ OEt ₂			X ²⁹	X ²⁵	X ^{25, 27}			
TiCl ₄					X ²⁷			
CoCl ₂		X ²⁵						
-								X ^{22, 25}

Dans un premier temps, des conditions similaires d'ouverture sur des benzyldèneacétals d'azépanes décrites par Y. Blériot²² ont été appliquées sur les benzyldèneacétals (**267**). Le traitement de (**267b**) ou (**267a**) avec 15 équivalents de DIBAL dans le toluène à 0°C a conduit à un mélange de produits d'ouverture *N*-méthyl (**268a**) et (**268b**) non attendus mais avec la régiosélectivité souhaitée.

Schéma 25 - Ouverture régiosélective du benzyldèneacétal (**267**)

L'ouverture régiosélective de l'acétal (**267**) ne semble pas être dirigée par la configuration du centre acétalique puisque les mêmes résultats sont obtenus en partant du composé (**267a**) ou (**267b**). Cette régiosélectivité pourrait être gouvernée d'une part par une gêne stérique entre le groupement benzyloxy et le DIBAL sur les intermédiaires avec une attaque en O-4 menant au produit d'ouverture minoritaire, et d'autre part, par l'influence du groupement carboxyl du Cbz qui pourrait se lier au DIBAL pour former un complexe intermédiaire bidentate menant au produit d'ouverture majoritaire (cf. Schéma 26).

Bien que des exemples de réduction des carbamates *N*-Cbz (ou *N*-Boc) pour fournir la méthylamine ont été reportés en présence de LiAlH₄ dans le THF à reflux,³⁰ cette réduction n'a jamais été décrite dans le cas de DIBAL ou à 0°C. Cette réaction secondaire inattendue est probablement due au large excès en DIBAL (cf. Schéma 26).

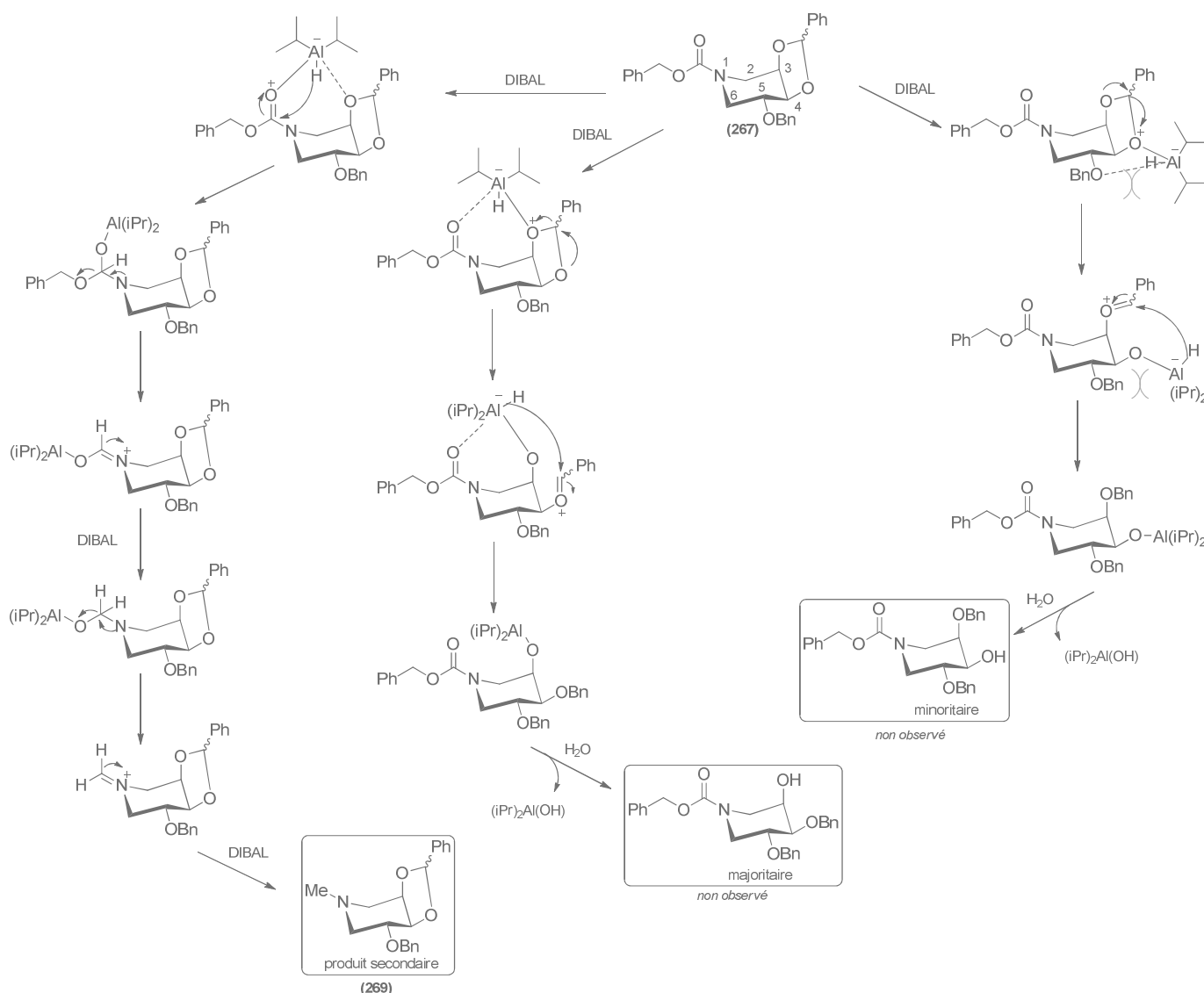


Schéma 26 - Mécanisme proposé pour l'ouverture du benzylidèneacétal (267) et la méthylation de l'amine

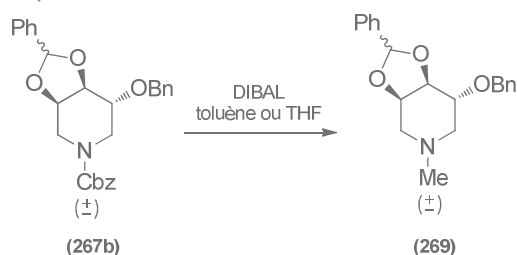
Afin de limiter cette réaction secondaire, nécessitant 3 équivalents de DIBAL (cf. mécanisme proposé Schéma 26), différentes conditions de température et nombre d'équivalent en DIBAL ont été évaluées sur le composé majoritaire (267b).

Tableau 4 - Résultats de l'ouverture du benzylidèneacétal (267b)

Entrée	DIBAL	Temps	Solvant	Température	Rendement (269)
1	3eq	1h	toluène	-78°C à -10°C	0%
2	3eq	4 jours	THF	-78°C à -10°C	0%
3	1,5eq + 1,5eq après une nuit	23h	toluène	0°C	69%
4	3eq	1h	toluène	0°C	53%

Aucune conversion du benzylidèneacétal (267b) n'a été observée après son traitement avec 3 équivalents de DIBAL dans le toluène ou le THF de -78°C à -10°C (entrées 1 et 2 du Tableau 4). Le traitement de (267b) avec 1,5 équivalents de DIBAL dans le toluène à 0°C n'a abouti à aucune conversion de l'acétal au bout de 21 heures de réaction. L'ajout de 1,5 équivalents de DIBAL supplémentaire à 0°C a conduit à la formation de l'acétal (269) avec un rendement de 69% après 2 heures de réaction (entrée 3 du Tableau 4). Le benzylidèneacétal (267b) n'ayant pas réagi a été

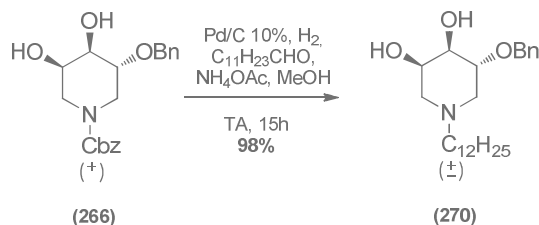
récupéré. Aucun autre produit n'a été formé au cours de cette réaction. Enfin, le traitement de (**267b**) avec 3 équivalents de DIBAL dans le toluène à 0°C a fourni sélectivement l'acétal (**269**) avec un rendement de 53% après 1 heure de réaction (entrée 4 du Tableau 4). Le benzylidèneacétal (**267b**) n'ayant pas réagi a pu être récupéré.

Schéma 27 - Optimisation des conditions d'ouverture de (**267**)

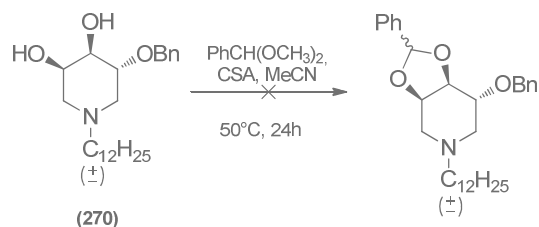
Ces résultats indiquent que la réaction secondaire de réduction du carbamate pour fournir la méthylamine est plus rapide que la réaction d'ouverture du benzylidèneacétal.

Remplacement du Cbz pour l'ouverture du benzylidèneacétal

Afin d'éviter la réduction du carbamate au cours de l'ouverture du benzylidèneacétal au DIBAL, le groupement Cbz a été remplacé par une chaîne dodécyle. Les conditions d'amination réductrice utilisées précédemment ont été adaptée pour empêcher l'hydrogénolyse du benzyléther de la pipéridine (**266**).³¹ Ainsi, le traitement de la pipéridine N-Cbz (**266**) sous atmosphère d'hydrogène en présence de palladium sur charbon, dodécanal et acétate d'ammonium a conduit quantitativement à la pipéridine N-dodécyle (**270**).

Schéma 28 - Synthèse de la pipéridine (**270**)

Enfin, la pipéridine (**270**) a été engagée dans une réaction d'acétalisation avec le benzaldéhyde diméthylacétal dans les mêmes conditions que précédemment.²² Aucune conversion n'a été observée après 24 heures de reflux dans l'acétonitrile. Un deuxième essai a été réalisé avec 1,5 équivalents de CSA au lieu de 0.2 équivalent, n'aboutissant à aucune conversion.

Schéma 29 - Formation du benzylidèneacétal de (**270**)

Le benzylidèneacétal a été impossible à obtenir à partir de la pipéridine (**270**). Cette alternative de synthèse a donc été abandonnée.

3) Troisième voie de synthèse

Enfin, la dernière méthode consiste à insérer une chaîne dodécyle de façon non sélective sur la pipéridine (**270**). La méthode d'alkylation utilisée par P. Compain et O.R. Martin sur des pipéridines similaires^{32, 33} a été appliquée à la pipéridine (**270**) en adaptant les quantités de NaH et de bromododécane pour limiter la formation de produit de dialkylation. Ainsi, le traitement de (**270**) avec 2,1 équivalents de NaH et 1 équivalent de bromododécane en présence de Bu₄NI a conduit aux produits de mono-alkylation (**271**) et (**272**) avec un rendement de 82% et un ratio 1:1.

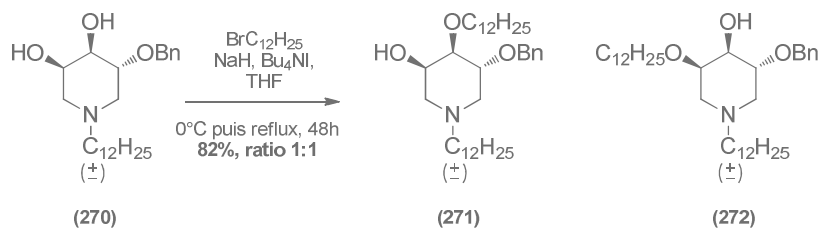


Schéma 30 - Synthèse des pipéridines mono-O-alkylées (**271**) et (**272**)

Enfin, la déprotection de l'éther benzylique de la pipéridine (**272**) a permis d'accéder au composé ciblé (**273**) avec un rendement de 98%.

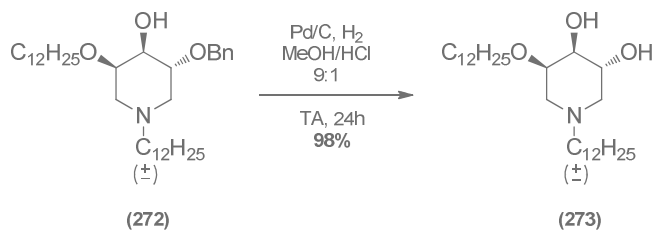


Schéma 31 - Synthèse de la pipéridine L125 ciblée (**273**)

Le composé ciblé (**273**) a ainsi été synthétisé de façon racémique en dix étapes à partir de l'éthanolamine commerciale avec un rendement global de 9%.

4) Dédoublément du mélange racémique

Afin d'accéder aux deux énantiomères du composé (**273**) énantiomériquement pur, le dédoublément des énantiomères des intermédiaires de synthèse (**256**), (**265**), (**266**), (**267a**), (**267b**) et (**270**) a été étudiée en chromatographie en phase supercritique analytique (SFC).

La meilleure résolution en condition analytique a été atteinte avec l'intermédiaire (**270**) sur une colonne Chiralpak IA-3 (particules de silices de 3 μ m immobilisées avec de l'amylose tris-(3,5-diméthylphénylcarbamate)), 250*4,6nm avec un gradient de méthanol+0,1% DEA comme additif dans la phase mobile CO₂.

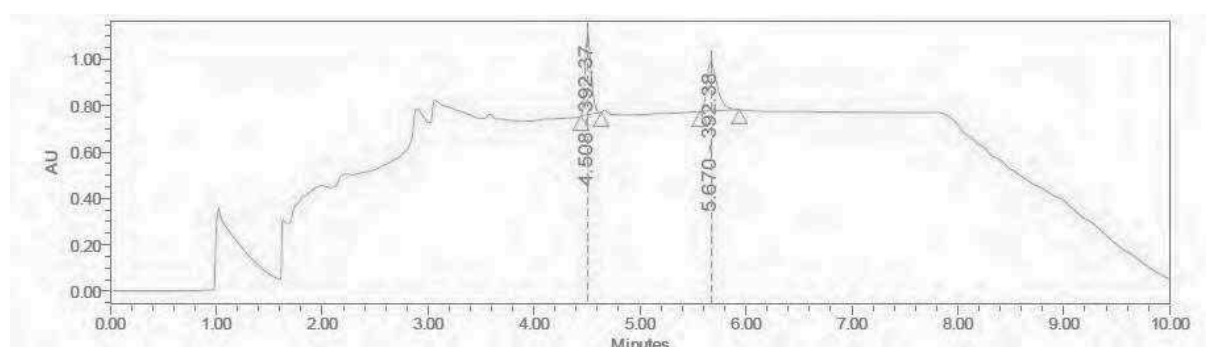


Figure 7 - Chromatogramme du composé (**270**) obtenu à 205nm

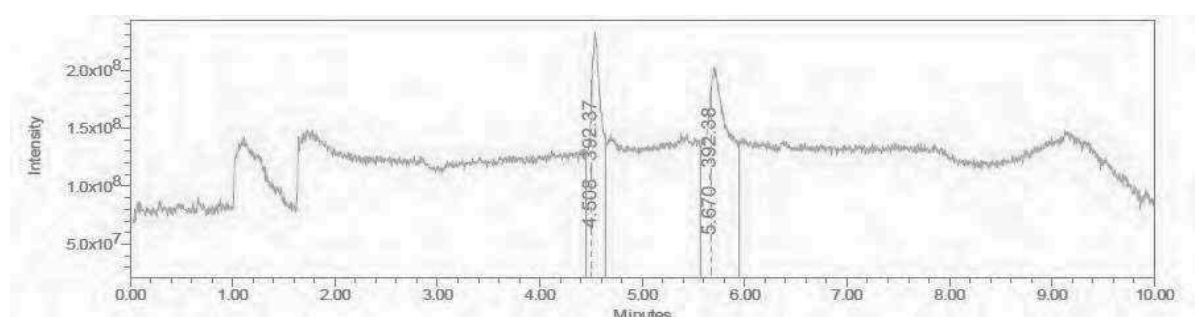


Figure 8 - Chromatogramme du composé (**270**) obtenu par courant total ionique

Cette séparation est suffisante pour être transposée en conditions préparatives. La séparation du racémate (**270**) est envisagée par la suite. Cette résolution permettra d'accéder séparément aux deux énantiomères de la pipéridine (**273**) après les étapes d'alkylation et de déprotection. La liaison de chaque énantiomère au domaine START de CERT, (-)-L125et (+)-L125, pourra alors être évaluée par le test *in vitro* de liaison spécifique (cf. Chapitre II).

IV. Conclusions et perspectives

1) Conclusions

Deux pipéridines trihydroxylées, identifiées lors de la conception rationnelle de ligands du domaine START de CERT, ont été synthétisées. Ces deux synthèses, réalisées en collaboration avec le Pr. A. Burtoloso (Institut de Chimie de São Carlos, Université de São Paulo, Brésil), s'appuient sur sa méthodologie pour la formation d'un motif dihydropyridin-3-one.

La première pipéridine ciblée L127 a pu être synthétisée sans difficulté particulière (cf. Schéma 32). L'aldéhyde (**253**), obtenu à partir de l'éthanolamine, et le diazophosphonate (**251**), obtenu à partir de la diphenylphosphite, ont été engagés dans une oléfination d'Horner-Wadworth-Emmons pour fournir un mélange de (*Z*) et (*E*) de γ -aminodiazocétone- α,β -insaturée (**254**). L'insertion NH catalysée au cuivre du composé (**254-Z**) a conduit à la dihydropyridin-3-one (**255**). Enfin, la fonctionnalisation de l'intermédiaire (**255**) par réduction de Luche, dihydroxylation sélective puis amination réductrice a permis d'accéder à la pipéridine (**258**). La pipéridine *N*-dodécyle (**258**) a ainsi été obtenue en sept étapes à partir de l'éthanolamine commerciale avec un rendement global de 10% et une pureté suffisante pour son évaluation *in vitro*.

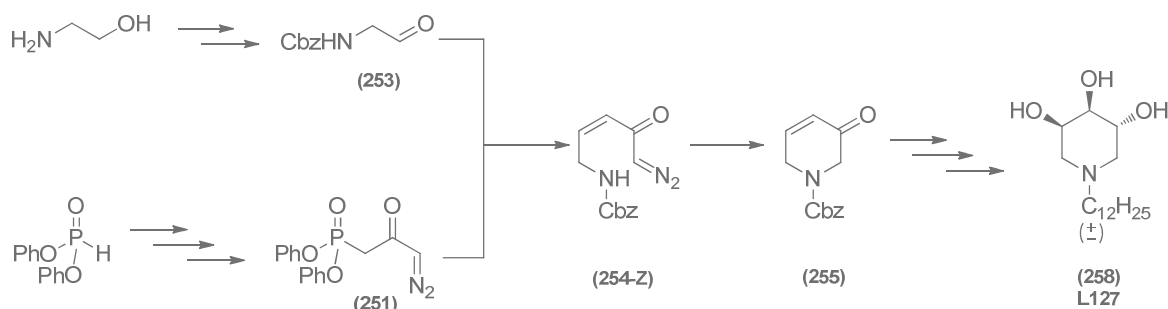


Schéma 32 - Bilan de synthèse de la pipéridine L127 *N*-dodécyle (**258**)

La synthèse de la deuxième pipéridine ciblée L125 s'est avérée plus problématique. Deux tentatives d'insertion sélective de la chaîne *O*-dodécyle sur différentes pipéridines *N*-substituées se sont avérées infructueuses.

La première tentative pour accéder au composé (**273**), encadrée en bleue sur le Schéma 33, consistait à protéger les 4,5-diols en position *trans* par la formation d'un butane-2,3-bisacétal afin d'insérer sélectivement la chaîne *O*-dodécyle en position 3. Cette protection sur les pipéridines (**257a**) (R=Cbz), (**258**) (R=C₁₂H₂₅) et (**264**) (R=Ts) a été impossible soit à cause d'une prédominance de la conformation *trans*-diaxiale, soit du fait d'une distance O4-O5 et d'un angle dièdre O4-C4-C5-O5 trop importants sur la conformation *trans*-diéquatoriale.

La deuxième tentative, encadrée en vert sur le Schéma 33, consistait à protéger les 3,4-diols en configuration *cis* par la formation d'un benzylidèneacétal sur la 5-benzyloxy pipéridine (**266**). Bien que la régiosélectivité de l'ouverture au DIBAL du benzylidèneacétal (**267**) permettait d'insérer préférentiellement la chaîne dodécyle en position O-3, la réaction secondaire de réduction du groupement Cbz pour former la *N*-méthylpipéridine, prépondérante sur la réaction d'ouverture, a

empêché l'accès au composé ciblé (**273**). Afin d'éviter la réduction du carbamate au cours de l'ouverture du benzylidèneacétal, le groupement Cbz a été remplacé par une chaîne dodécyle. En revanche, la formation du benzylidèneacétal a échoué sur la 5-benzyloxy-pipéridine *N*-dodécyle (**270**).

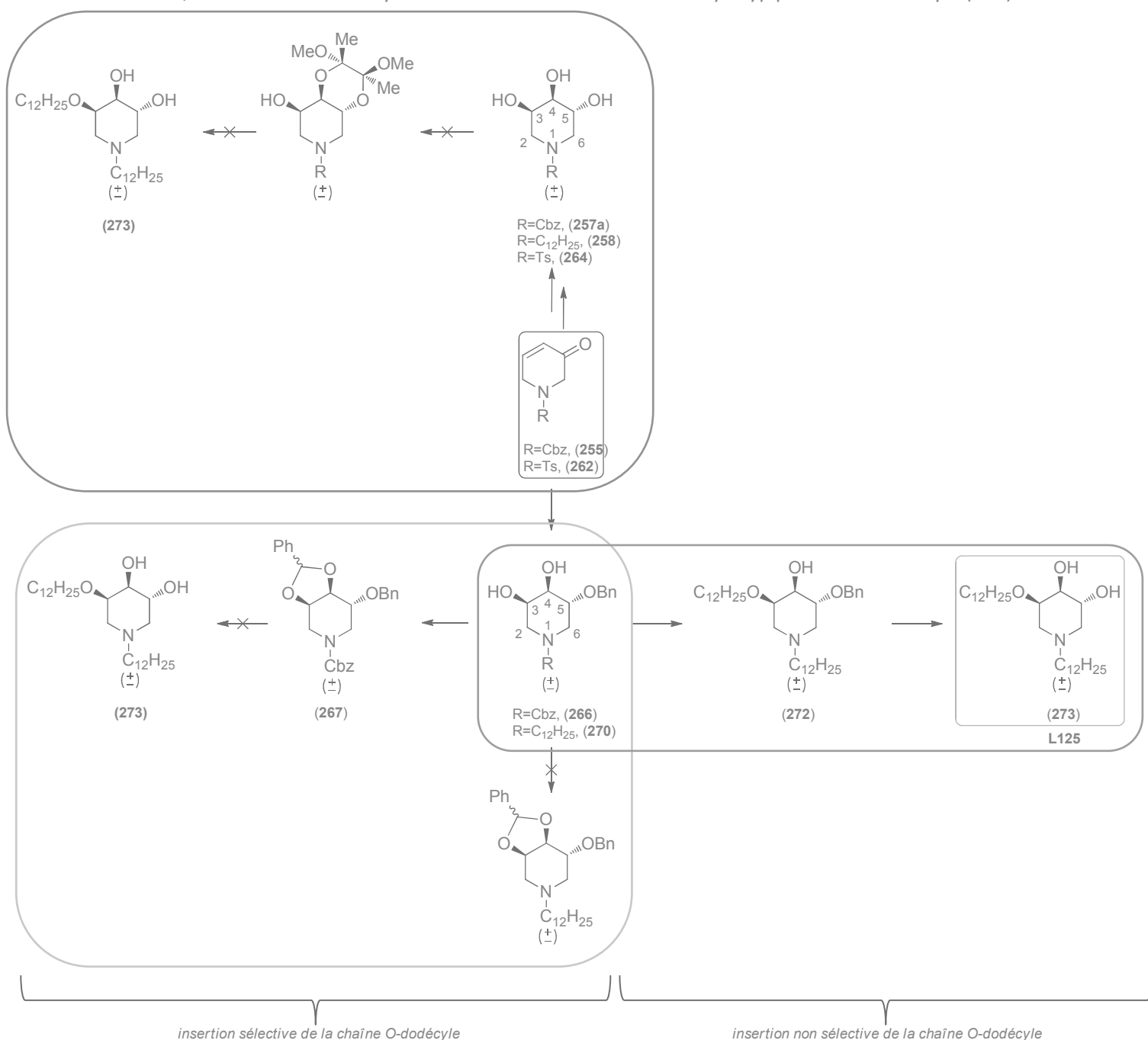


Schéma 33 – Bilan de synthèse de la pipéridine ciblée (**273**)

Enfin, la pipéridine ciblée racémique (**273**) a pu être obtenue par insertion non sélective de la chaîne dodécyle sur la pipéridine (**270**), puis déprotection, avec un rendement global de 9% sur 10 étapes à partir de l'éthanolamine commerciale (voie encadrée en rose sur le Schéma 33).

Un criblage de conditions de séparation en chromatographie SCF chirale a permis d'établir des conditions analytiques optimales pour accéder séparément aux deux énantiomères de

l'intermédiaire (**270**). Ces conditions pourront être transposées en conditions préparatives et ainsi permettre d'accéder aux deux énantiomères du composé (**273**) après l'insertion non sélective de la chaîne *O*-dodécyle puis déprotection. L'évaluation de la liaison au domaine START de CERT du racémate (**273**) et de chaque énantiomère est envisagée.

2) Perspectives

D'autres iminosucres ont été identifiés au cours de l'étude de modélisation moléculaire comme ligands potentiels du domaine START de CERT (cf. Chapitre II, paragraphe IV)2)b)).

Parmi ces ligands, la pipéridine L060 est ressortie prometteuse. Elle serait accessible à partir de la dihydropyridinone (**274**) par addition de Michael d'un groupement benzyloxy, réduction de la cétone, *O*-alkylation puis déprotections successives. Cette dihydropyridinone (**274**) pourrait être synthétisée par la voie du Pr. A. Burtoloso¹ via une réaction d'HWE sur l'aldéhyde (**276**) dérivant de la *L*-sérine et le diazophosphonate (**251**), puis insertion NH sur le produit d'oléfine de géométrie (*Z*) (**275**).

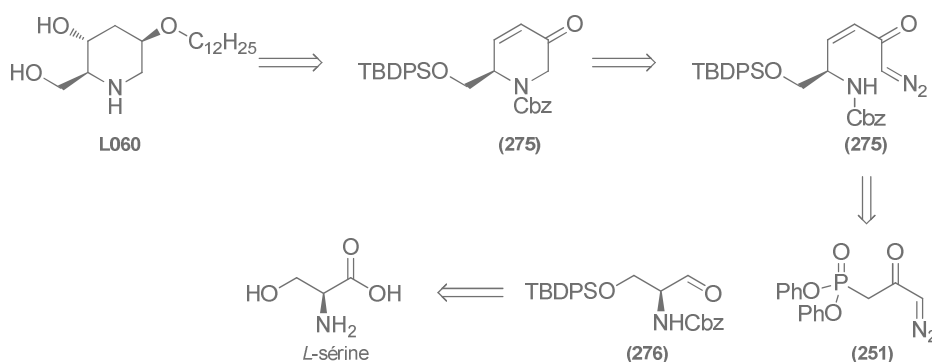


Schéma 34 – Analyse rétrosynthétique du ligand L060

L'azépane L046 est aussi ressorti de la conception *in silico*. Ce ligand serait accessible par ouverture sélective de l'époxyazépane (**277**) en présence d'hydruire par la méthode de Y. Blériot.³⁴ L'époxyde serait issu de l'azépane insaturé (**278**) obtenu par métathèse de fermeture de cycle sur (**279**). L'intermédiaire (**279**) proviendrait de l'alkylation de l'amine (**280**), obtenue par α -hydroxyallylation diastéréosélective sur l'aldéhyde de Garner.³⁵

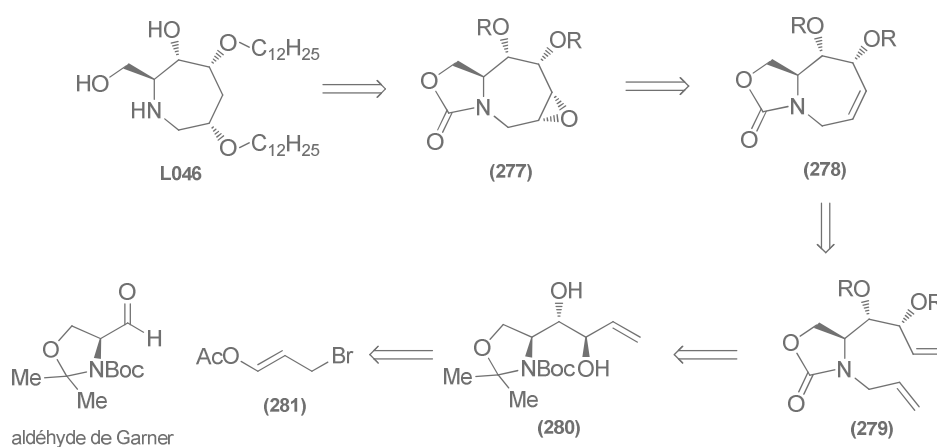


Schéma 35 - Analyse rétrosynthétique du ligand L046

L'*epi*-nœuromycine L124 représenterait aussi un mime du céramide dans sa conformation lié à la protéine CERT. Elle serait accessible par la voie de synthèse de M. Bols ³⁶ à partir de la β -D-lyxopyranose. Le ligand L124 serait ainsi obtenu par insertion des chaînes dodécyles sur la pipéridine (**282**), issue d'un réarrangement du carbohydrate (**283**) en milieu acide. Ce carbohydrate (**283**) serait le produit de l'hydrogénation sélective du groupement nitro de (**284**), lui-même formé par mono-oxydation sélective de Tsuda ³⁷ sur la benzyl- β -D-lyxopyranose (**285**) puis réaction de Henry.

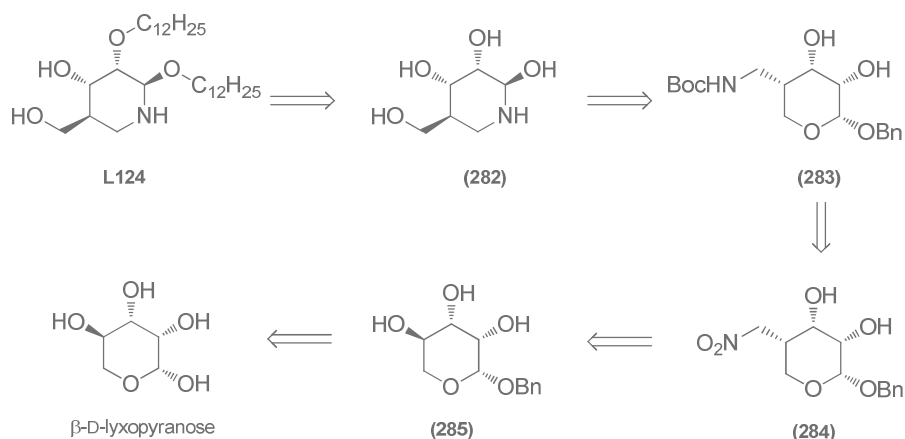


Schéma 36 - Analyse rétrosynthétique du ligand L124

Enfin la pipéridine L141, dérivée de la déoxynojirimycine conçue *in silico* est en cours de synthèse au laboratoire du Pr. P. Compain.

La synthèse de l'ensemble de ces ligands sera intéressante à réaliser afin de pouvoir évaluer leur liaison avec la protéine et vérifier la qualité prédictive du modèle *in silico* développé au cours de la thèse.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

The following solvents and reagents were dried prior to use. Dichloromethane (CH_2Cl_2), tetrahydrofuran (THF), acetonitrile (MeCN) were purified and dried with a system MB SPS 800 (MBRAUN). Dimethylformamide (DMF) (99.8% Acros Organics) and pyridine (99.5%, Acros Organics) were bought anhydrous. Benzene and toluene were freshly distilled from sodium/benzophenone, methanol (MeOH) was freshly distilled from magnesium/iodide and chloroform (CHCl_3) was freshly distilled from calcium hydride. Triethylamine (Et_3N) was distilled from calcium hydride and stored over potassium hydroxide pellets.

Thin layer chromatography (TLC) was performed using pre-coated TLC sheets Alugram Xtra SiLG (Machery Nagel) and observed under UV light (254nm) and/or revealed with a 10% phosphomolybdic acid solution in ethanol. Products were purified by column chromatography with SDS 35-70 μm flash silica gel.

^1H and ^{13}C NMR spectrum were obtained with Bruker Advance 300MHz spectrometer. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) relative to residual deuterated solvent peak. For NMR spectrum description, following abbreviations are used: s (singlet), bs (broad singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet) and m (multiplet). Coupling constants are expressed in Hertz (Hz).

Mass spectrometry (MS) data were obtained on a ThermoQuest TSQ 7000 spectrometer and high resolution mass spectrometry data were performed on a Xevo G2 QTOF spectrometer.

Molecules are named according to the IUPAC nomenclature, but the numbering for NMR spectrum interpretation is made according to compound scheme for reasons of convenience.

Procedure to prepare diazomethane

A solution of Diazald® (16g, 75mmol, 1 eq) in Et_2O (130mL) was added dropwise on a solution of KOH (4.5g, 80mmol, 1.1 eq) in H_2O (9mL) and methyl Carbitol™ (26mL) at 65°C. The diazomethane generated was condensed on dry ice to furnish a solution of diazomethane in Et_2O ($^{\text{mM}}$ 0.4M).

General procedure for NH-insertion

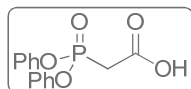
To a solution of α,β -unsaturated-(Z)-diazoketone (1 eq) in anhydrous benzene (0.05M) at reflux under nitrogen was added $\text{Cu}(\text{acac})_2$ (0.1 eq). The reaction mixture was stirred at reflux for one minute and concentrated to dryness.

General procedure for Luche reduction

A solution of CeCl_3 (1 eq) in anhydrous MeOH (0.4M) was added to a solution of ketone (1 eq) in anhydrous CH_2Cl_2 (0.06M) at -78°C under argon. The mixture was stirred for 20 minutes and NaBH_4 (1.5 eq) was added. After 1 hour of stirring at -78°C (TLC monitoring), the reaction was quenched by addition of water and allowed to warm to room temperature. Then, the mixture was extracted with CH_2Cl_2 and the combined extracts were washed with brine, dried over sodium sulfate and was evaporated to dryness.

General procedure for cis-dihydroxylation

To a solution of alkene (1 eq) in H₂O/acetone (1:9) (0.03M) was added *N*-methylmorpholine (2 eq) and a solution of OsO₄ in *t*BuOH at 0.1M (0.05 eq). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 days and quenched with saturated aqueous solution of Na₂S₂O₃. Then, the mixture was extracted with EtOAc and the combined extracts were washed with brine, dried over sodium sulfate and evaporated to dryness.

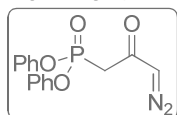
2-(diphenoxyphosphoryl)acetic acid (250)

To a solution of diphenylphosphite (9.60mL, 50mmol, 1 eq) in anhydrous CH₂Cl₂ (50mL) at 0°C under nitrogen was added benzylbromoacetate (7.85mL, 50mmol, 1 eq) and triethylamine (9.85mL, 70mmol, 1.4 eq). The mixture was allowed to reach room temperature and stirred for 1 hour. Then, the reaction was quenched by addition of water. The mixture was extracted with EtOAc and the combined organic extracts were washed water and brine. Then, the organic layer was dried over sodium sulfate and evaporated to dryness, to afford a yellow oil. The crude oil was purified by flash chromatography on silica gel (PE/ EtOAc 80:20) to give the benzylester as a colorless oil (5.87g). This compound was directly engaged in the next step. A solution of benzylester (5.87g, 15mmol, 1 eq) and Pd/C 10% (0.16g, 1.5mmol, 0.1 eq) in EtOAc (51 mL) was stirred at room temperature for 3 to 4 hours under H₂ atmosphere. Then, the mixture was filtrated over celite and the filtercake was washed with EtOAc. The filtrate was evaporated to dryness to give the acid (**250**) (4.25g, 29% over two steps) as a white amorphous solid.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7.50-7.10 (m, 10H, H_{ar}); 4.50 (s, 1H, H_{acid}); 3.33 (d, 2H, CH₂, J_{H-P}=21.6Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 166.2 (C=O); 149.6, 129.5, 125.3, 120.3 (C_{ar}); 33.3 (d, CH₂, J_{C-P}=137.5Hz).

HRMS *m/z*: calcd for C₁₄H₁₄O₅P [M+H]⁺: 293.0579; found: 293.0588.

Diphenyl (3-diazo-2-oxopropyl)phosphonate (251)

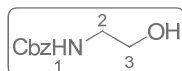
To a solution of (**250**) (1.60g, 5.48mmol, 1 eq) in anhydrous chloroform (13.7mL) at 0°C under argon was added oxalyl chloride (1.41mL, 16.43mmol, 3 eq). The reaction mixture was refluxed for 2 hours and evaporated under reduced pressure. The residue was maintained under argon atmosphere and dissolved in anhydrous THF (5.2mL). The resulting acid chloride solution was poured into a solution of diazomethane in Et₂O (42mL) at 0°C under argon. The mixture was stirred at 0°C until gas evolution ceased and then evaporated to dryness. This crude product was purified by flash chromatography on silica gel (Et₂O/ PE 80:20 to 100:0) to give (**251**) as a yellow solid (1.21g, 69%).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7.25-7.00 (m, 10H, H_{ar}); 5.57 (s, 1H, CH=N₂); 3.13 (d, 2H, CH₂, J_{H-P}=21.9Hz).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 183.5 (C=O); 149.6 (d, C_{ar} , $J_{C-P}=8.8\text{Hz}$); 129.6 (d, C_{ar} , $J_{C-P}=1.1\text{Hz}$); 125.3 (d, C_{ar} , $J_{C-P}=1.4\text{Hz}$); 120.4 (d, C_{ar} , $J_{C-P}=4.3\text{Hz}$); 56.7 ($\underline{\text{CH}}=\text{N}_2$); 39.3 (d, $\underline{\text{CH}}_2$, $J^3_{C-P}=131.9\text{Hz}$).

HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 317.0686; found: 317.0671.

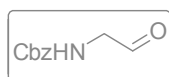
Benzyl (2-hydroxyethyl)carbamate (252)



A solution of benzylchloroformate (3.73mL, 26.2mmol, 0.8 eq) in CH_2Cl_2 (20 mL) was added to a solution of ethanolamine (2.00g, 32.7mmol, 1 eq) in anhydrous CH_2Cl_2 (30 mL) at 0°C under nitrogen. The mixture was stirred overnight and allowed to warm to room temperature. Then, a saturated aqueous solution of NaHCO_3 was added and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic extracts were dried over sodium sulfate and evaporated to dryness to give **(252)** as a white solid (4.76g, 93%). This compound showed identical spectroscopic data to those reported in the literature.³⁸

^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.40-7.35 (m, 5H, H_{ar}); 5.12 (s, 2H, $\underline{\text{CH}}_2$ Cbz); 3.74 (t, 2H, H-3, $J^3_{3-2}=5.1\text{Hz}$); 3.37 (q, 2H, H-2, $J^3_{2-3}=J^3_{2-NH}=5.1\text{Hz}$); 1.86 (bs, 1H, H-1).

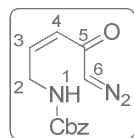
Benzyl (2-oxoethyl)carbamate (253)



IBX (3.03g, 10.8mmol, 3 eq) was added to a solution of alcohol **(252)** (705mg, 3.61mmol, 1 eq) in EtOAc (36.1mL). The mixture was heated at reflux for 3h (TLC monitoring) before being cooled to room temperature and filtrated over celite. Then, the filtrate was concentrated in vacuum to furnish aldehyde **(253)** (671mg, 96%). To avoid decomposition, this compound was directly engaged in the next step without characterization.

Benzyl (5-diazo-4-oxopent-2-en-1-yl)carbamate(254)

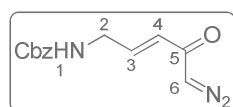
To a suspension of $t\text{BuOK}$ (214mg, 1.91mmol, 1.1 eq) in anhydrous THF (6.35mL) at 0°C under argon was slowly added a solution of diazophosphonate **(251)** (548mg, 1.74mmol, 1 eq) in anhydrous THF (33.8mL). The mixture was stirred at 0°C for 10 minutes and cooled at -78°C . Then a solution of aldehyde **(253)** (335mg, 1.74mmol, 1 eq) in anhydrous THF (8.68mL) was added dropwise. The mixture was stirred under argon at -78°C for 1 hour and at 0°C for 1 additional hour. Then, the reaction was quenched with saturated aqueous solution of NH_4Cl . The mixture was extracted with EtOAc and the combined organic extracts were washed with water and brine. Then, the organic layer was dried over sodium sulfate and evaporated to dryness to give **(254)** as a mixture of *E* and *Z* isomers (620mg, 68%, ratio *Z*:*E* = 6:4). Each isomer was separated by flash chromatography on silica gel (Et_2O / PE 80:20 to 100:0).

(Z)-Benzyl (5-diazo-4-oxopent-2-en-1-yl)carbamate

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.45-7.25 (m, 5H, H_{ar}); 6.15-6.05 (m, 1H, H-3); 5.91 (d, 1H, H-4, $J_{3-4}^3 = 10.2\text{Hz}$); 5.53 (bs, 1H, H-1); 5.34 (s, 1H, H-6); 5.10 (s, 2H, CH_2 Cbz); 4.35-4.25 (m, 2H, H-2).

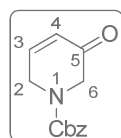
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 185.1 (C-5); 156.4 (C=O Cbz); 136.3, 135.9, 128.3, 128.0, 127.9 (C_{ar}), 125.3, 120.3 (C-3,4); 66.5 (CH_2 Cbz); 57.3 (C-6); 39.7 (C-2).

HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 260.1035; found: 260.1040.

(E)-Benzyl (5-diazo-4-oxopent-2-en-1-yl)carbamate

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.32-7.03 (m, 5H, H_{ar}); 6.66 (td, 1H, H-3, $J_{3-4}^3 = 15.3\text{Hz}$, $J_{3-2}^3 = 5.1\text{Hz}$); 5.98, (d, 1H, H-4, $J_{3-4}^3 = 15.3\text{Hz}$); 5.22 (s, 1H, H-6); 5.04 (s, 2H, CH_2 Cbz); 3.89 (t, 2H, H-2, $J_{3-2}^3 = 4.8\text{Hz}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 184.1 (C-5); 156.2 (C=O Cbz); 136.2, 129.7, 128.3, 127.6, (C_{ar}); 124.9, 120.3 (C-3,4); 66.6 (CH_2 Cbz); 56.7 (C-6); 41.5 (C-2).

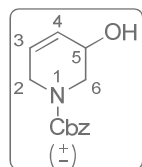
Benzyl 5-oxo-5,6-dihydropyridine-1(2H)-carboxylate (255)

Prepared from **(254-Z)** (117mg, 0.452mmol) according to the general procedure for NH insertion. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (Et_2O / PE 80:20) to give **(255)** as a white gum (57mg, 55%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.5-7.25 (m, 5H, H_{ar}); 7.15-6.90 (m, 1H, H-3); 6.21 (d, 1H, H-4, $J_{3-4}^3 = 10.2\text{Hz}$); 5.20 (s, 2H, CH_2 Cbz); 4.35-4.25 (m, 2H, H-2); 4.22 (s, 2H, H-6).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 192.6 (C-5); 154.9 (C=O); 136.0, 135.9, 128.5, 128.1, 128.0, 128.0 (C_{ar}); 128.5, 128.3 (C-3,4); 67.7 (CH_2 Cbz); 66.9 (C-6); 42.9 (C-2).

HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 232.0974; found: 232.0973.

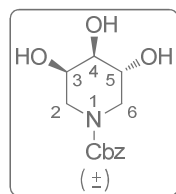
Benzyl 5-hydroxy-5,6-dihydropyridine-1(2H)-carboxylate (256)

Prepared from **(255a)** (174mg, 0.753mmol) according to the general procedure for Luche reduction. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/ PE 50:50) to give **(256a)** as colorless oil (145mg, 82%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.45-7.30 (m, 5H, H_{ar}); 5.98-5.74 (m, 2H, H-4,3); 5.16 (s, 2H, CH_2 Cbz); 4.30-4.15 (m, 1H, H-5); 3.97 (AB, 2H, H-6, $J^2_{6a-6b}=18\text{Hz}$, $\Delta\delta=0.21\text{ppm}$); 3.75-3.50 (m, 2H, H-2); 2.18 (bs, 1H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 75 MHz) δ (ppm): 157.4 (C=O); 138.2 (C_{ar}); 137.3, 135.2 (C-3,4); 129.7, 129.2, 129.0, 127.6, 127.2 (C_{ar}); 68.5 (CH_2 Cbz); 64.2 (C-5); 44.4 (C-2).

HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_3\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: 256.0950; found: 256.0949.

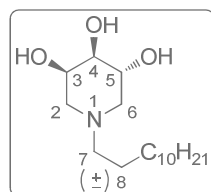
(3*R,5*R**)-benzyl-3,4,5-trihydroxypiperidine-1-carboxylate (257a)**

Prepared from **(256)** (19mg, 0.081mmol) according to the general procedure for *cis*-dihydroxylation. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/ MeOH 85:15) to give **(257a)** as white oil (17mg, 78%) (Two rotamers).

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 300 MHz) δ (ppm): 7.40-7.25 (m, 5H, H_{ar}); 5.10 (s, 2H, CH_2 Cbz); 3.95-3.86 (m, 1H, H-3); 3.85-3.50 (m, 4H, H-6a, 5, 2a, 4); 3.45-3.35 (m, 1H, H-2b); 3.25-3.05 (m, 1H, H-6b).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 75 MHz) δ (ppm): 156.5 (C=O); 136.8, 128.2, 127.7, 127.5 (C_{ar}); 73.3, 73.0 (C-4); 67.7, 67.5 (C-5); 67.1, 67.0 (CH_2 Cbz); 66.9, 66.7 (C-3); 46.1, 44.2 (C-6,2).

HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_5\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: 290.1004; found: 290.1012.

(3*R,5*R**)-1-dodecylpiperidine-3,4,5-triol (258)**

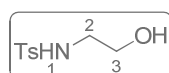
To a solution of **(257a)** (38mg, 0.142mmol, 1 eq) in $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (3:7) (2.85mL) was added dodecanal (46 μL , 0.206mmol, 1.45 eq) and Pd/C 10% (15mg, 0.142mmol, 1 eq). The mixture was stirred at room temperature for 9 hours under H_2 atmosphere. Then, the mixture was filtrated over celite and the filtercake was washed with MeOH/ H_2O . The filtrate was evaporated to dryness and the crude product was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/MeOH 85:15) to give **(258)** as colorless oil (32mg, 74%).

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 300 MHz) δ (ppm): 3.92 (dt, 1H, H-3, $J^3_{3-2a} = 5.7\text{Hz}$, $J^3_{3-4} = J^3_{3-2b} = 3.0\text{Hz}$); 3.82 (td, 1H, H-5, $J^3_{5-4} = J^3_{5-6b} = 7.5\text{Hz}$, $J^3_{5-6a} = 3.9\text{Hz}$); 3.43 (dd, 1H, H-4, $J^3_{4-5} = 7.5\text{Hz}$, $J^3_{4-3} = 3.0\text{Hz}$); 2.90-2.75 (m, 2H, H-6a, 2a); 2.50-2.40 (m, 2H, H-7); 2.40-2.30 (m, 1H, H-2b); 2.25-2.12 (m, 1H, H-6b); 1.60-1.45 (m, 2H, H-8); 1.40-1.22 (m, 18H, H-9 to H-17); 0.90 (t, 3H, H-18).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 75 MHz) δ (ppm): 69.5 (C-4); 68.9 (C-3,5), 59.3 (C-7); 57.9, 57.4 (C-2,6); 33.2, 4 x 30.9, 30.8, 30.6, 28.7, 27.5, 23.9 (C-8 to C-17); 14.6 (C-18).

HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{36}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 302.2695; found: 302.2692.

***N*-(2-hydroxyethyl)-4-methylbenzenesulfonamide (259)**

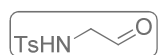


To a solution of tosyl chloride (1.28g, 6.73mmol, 1.1 eq) in CH_2Cl_2 (15mL) at 0°C under nitrogen was added ethanolamine (374mg, 6.12mmol, 1 eq) and triethylamine (0.94mL, 6.73mmol, 1.1 eq). The mixture was stirred overnight and allowed to warm to room temperature. Then, the reaction mixture was diluted with CH_2Cl_2 and washed with water. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 and the combined organic layers were dried over magnesium sulfate and evaporated to dryness. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5 to 90:10) to give **(259)** as colorless oil (1.13g, 86%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.66-7.59 (m, 2H, H_{ar}); 7.19-7.13 (m, 2H, H_{ar}); 3.52 (t, 2H, H-3, $J^3_{3-2} = 5.1\text{Hz}$); 2.90 (q, 2H, H-2, $J^3_{2-3} = J^3_{2-\text{NH}} = 5.1\text{Hz}$); 2.27 (s, 3H, Me).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 143.2, 136.2, 129.5, 126.8 (C_{ar}); 60.8 (C-3); 45.0 (C-2); 21.2 (Me).

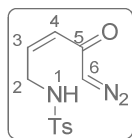
4-methyl-*N*-(2-oxoethyl)benzenesulfonamide (260)



IBX (1.62g, 5.79mmol, 3 eq) was added to a solution of alcohol **(259)** (415mg, 1.93mmol, 1 eq) in EtOAc (19.3mL). The mixture was heated at reflux for 3h (TLC monitoring) before being cooled to room temperature and filtrated over celite. Then, the filtrate was concentrated in vacuum to furnish aldehyde **(260)** (411mg, quantitative yield). To avoid decomposition, this compound was directly engaged in the next step without characterization.

***N*-(5-diazo-4-oxopent-2-en-1-yl)-4-methylbenzenesulfonamide (261)**

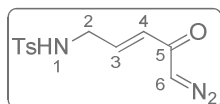
To a suspension of *t*BuOK (238mg, 2.12mmol, 1.1 eq) in anhydrous THF (7.10mL) at 0°C under argon was slowly added a solution of diazophosphonate **(251)** (610mg, 1.93mmol, 1 eq) in anhydrous THF (39.0mL). The mixture was stirred at 0°C for 10 minutes and cooled at -78°C . Then a solution of aldehyde **(260)** (411mg, 1.93mmol, 1 eq) in anhydrous THF (7.10mL) was added dropwise. The mixture was stirred under argon at -78°C for 1 hour and at 0°C for 1 additional hour. Then, the reaction was quenched with saturated aqueous solution of NH_4Cl . The mixture was extracted with EtOAc and the combined organic extracts were washed with water and brine. Then, the organic layer was dried over sodium sulfate and evaporated to dryness to give **(261)** as a mixture of *E* and *Z* isomers (171mg, 32%, ratio *Z*:*E* = 6:4). Each isomer was separated by flash chromatography on silica gel ($\text{Et}_2\text{O}/\text{PE}$ 80:20 to 100:0).

(Z)-N-(5-diazo-4-oxopent-2-en-1-yl)-4-methylbenzenesulfonamide

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.78-7.72 (m, 2H, H_{ar}); 7.35-7.25 (m, 2H, H_{ar}); 6.13-6.02 (m, 1H, H-3); 5.89 (d, 1H, H-4, $J^3_{3-4} = 11.1\text{Hz}$); 5.37 (bs, 1H, H-1); 5.31 (s, 1H, H-6); 4.10-4.00 (m, 2H, H-2); 2.43 (s, 3H, Me).

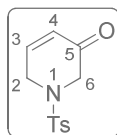
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 185.0 (C-5); 143.5 (C_{ar}); 142.0 (C-3); 136.7 (C_{ar}); 129.8 (C-4); 129.7, 127.0, 126.4 (C_{ar}); 57.9 (C-6); 41.8 (C-2); 21.4 (Me).

HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 280.0756; found: 280.0762.

(E)-N-(5-diazo-4-oxopent-2-en-1-yl)-4-methylbenzenesulfonamide

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.80-7.70 (m, 2H, H_{ar}); 7.35-7.25 (m, 2H, H_{ar}); 6.63 (td, 1H, H-3, $J^3_{3-4} = 15.6\text{Hz}$, $J^3_{3-2} = 5.1\text{Hz}$); 6.13 (d, 1H, H-4, $J^3_{3-4} = 15.3\text{Hz}$); 5.37 (s, 1H, H-6); 3.78-3.70 (m, 2H, H-2); 2.41 (s, 3H, Me).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 185.1 (C-5); 143.7, 136.5, 129.8 (C_{ar}); 129.7, 127.2 (C-3,4); 127.0 (C_{ar}); 56.4 (C-6); 43.7 (C-2); 21.4 (Me).

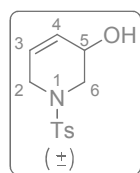
1-tosyl-1,6-dihydropyridin-3(2H)-one (262)

Prepared from **(261-Z)** (100mg, 0.358mmol) according to the general procedure for NH insertion. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (Et_2O / PE 80:20) to give **(262)** as white gum (46mg, 51%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.70-7.65 (m, 2H, H_{ar}); 7.40-7.30 (m, 2H, H_{ar}); 7.00-6.90 (m, 1H, H-3); 6.04 (d, 1H, H-4, $J^3_{3-4} = 9.9\text{Hz}$); 4.02-3.94 (m, 2H, H-2); 3.79 (s, 2H, H-6); 2.42 (s, 3H, Me).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 191.7 (C-5); 145.1, 127.9 (C-3,4); 144.5, 132.7, 130.1, 127.7 (C_{ar}); 52.8, 44.5 (C-2,6); 21.5 (Me).

HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{NO}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 252.0694; found: 252.0703.

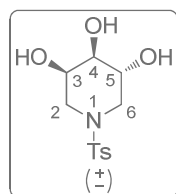
1-tosyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin-3-ol (263)

Prepared from **(262)** (43mg, 0.171mmol) according to the general procedure for Luche reduction. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/ PE 50:50 to 70:30) to give **(263)** as colorless oil (27mg, 63%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.70-7.65 (m, 2H, H_{ar}); 7.40-7.30 (m, 2H, H_{ar}); 5.94-5.86 (m, 1H, H-3); 5.84-5.77 (m, 1H, H-4); 4.25-4.18 (m, 1H, H-5); 3.80-3.70 (m, 1H, H-6a); 3.42-3.30 (m, 2H, H-2); 3.11-3.03 (m, 1H, H-6b); 2.43 (s, 3H, Me).

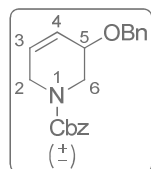
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 148.9, 132.9, 129.8, 127.7 (C_{ar}); 128.1, 127.8 (C-3,4); 63.1 (C-5); 50.1 (C-6); 44.8 (C-2); 21.5 (Me).

HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NO}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 254.0851; found: 254.0840.

(3*R,5*R**)-1-tosylpiperidine-3,4,5-triol (264)**

Prepared from **(263)** (27mg, 0.107mmol) according to the general procedure for *cis*-dihydroxylation. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc) to give **(264)** as white oil (23mg, 74%). This compound showed identical spectroscopic data reported in the literature.¹

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.60-7.53 (m, 2H, H_{ar}); 7.35-7.28 (m, 2H, H_{ar}); 3.85 (dt, 1H, H-3, $J^3_{3-2a}=6.9\text{Hz}$, $J^3_{3-4}=J^3_{3-2b}=3.3\text{Hz}$); 3.71 (td, 1H, H-5, $J^3_{5-4}=J^3_{5-6b}=6.3\text{Hz}$, $J^3_{5-6a}=3.3\text{Hz}$); 3.35 (dd, 1H, H-4, $J^3_{4-5}=6.6\text{Hz}$, $J^3_{4-3}=3.3\text{Hz}$); 3.08 (dd, 1H, H-6a, $J^2_{6a-6b}=11.7\text{Hz}$, $J^3_{6a-5}=3.3\text{Hz}$); 2.97 (dd, 1H, H-2a, $J^2_{2a-2b}=11.7\text{Hz}$, $J^3_{2a-3}=6.9\text{Hz}$); 2.89 (dd, 1H, H-2b, $J^2_{2b-2a}=11.7\text{Hz}$, $J^3_{2b-3}=3.3\text{Hz}$); 2.70 (dd, 1H, H-6b, $J^2_{6a-6b}=11.7\text{Hz}$, $J^3_{6a-5}=6.3\text{Hz}$); 2.34 (s, 3H, Me).

Benzyl 5-(benzyloxy)-5,6-dihydropyridine-1(2*H*)-carboxylate (265)

To a suspension of NaH (6.20mg, 0.257mmol, 1.2 eq) in anhydrous DMF (0.97mL) at 0°C under argon was added a solution of **(256)** (50mg, 0.214mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (1.33mL). After 30 minutes of stirring at 0°C, benzyl bromide (33μL, 0.279mmol, 1.3 eq) was added. The mixture was stirred overnight under argon and allowed to reach room temperature. Then, the reaction was quenched with water. The mixture was extracted with Et_2O and the combined organic extracts were washed with water and brine. The organic layer was dried over sodium sulfate and

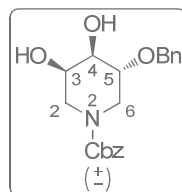
evaporated to dryness. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/ PE 20:80) to give **(265)** as a yellow oil (52mg, 75%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.45-7.30 (m, 10H, H_{ar}); 6.00-5.77 (m, 2H, H-4,3); 5.18 (s, 2H, CH_2 Cbz); 4.78-4.50 (m, 2H, H-2); 4.15-4.05 (m, 1H, H-5); 3.99 (s, 2H, CH_2 Bn); 3.96-3.56 (m, 2H, H-6).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 155.2 (C=O); 138.1, 136.6 (C_{ar}); 128.4, 128.3 (C-3,4); 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.4, 126.7, 126.1 (C_{ar}); 70.6 (CH_2 Bn); 69.8 (C-5); 67.1 (CH_2 Cbz); 67.0 (C-6); 43.3 (C-2).

HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 324.1600; found: 324.1591.

(3*R,4*R**,5*R**)-benzyl 3-(benzyloxy)-4,5-dihydropiperidine-1-carboxylate (266)**



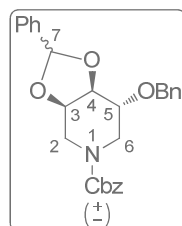
Prepared from **(265)** (76mg, 0.235mmol) according to the general procedure for *cis*-dihydroxylation. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/ PE 50:50 to 100:0) to give **(266)** as a colorless oil (76mg, 91%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.45-7.25 (m, 10H, H_{ar}); 5.13 (s, 2H, CH_2 Cbz); 4.82-4.46 (m, 2H, CH_2 Bn); 4.25-3.75 (m, 3H, H-6a,2a,3); 3.75-3.55 (m, 2H, H-5, 4); 3.43-2.93 (m, 2H, H-6b, 2b); 2.54 (bs, 2H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 156.0 (C=O); 137.8, 128.6, 128.5, 128.4, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.7, 127.6, 127.6 (C_{ar}); 75.1 (C-5); 72.4 (C-4); 71.8 (CH_2 Bn); 67.4 (CH_2 Cbz); 67.0 (C-3); 46.4 (C-2); 43.9 (C-6).

HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 358.1654; found: 358.1649.

(2,3*aR,7*R**,7*aS**)-benzyl-7-(benzyloxy)-2-phenyltetrahydro-[1,3]dioxolo[4,5-*c*]pyridine-5(6*H*)-carboxylate (267)**



To a solution of **(266)** (76mg, 0.213mmol, 1 eq) in anhydrous MeCN (11.0mL) under argon was added camphorsulfonic acid (9.9mg, 42.6 μmol , 0.2 eq) and benzaldehyde dimethylacetal (96 μL , 63.8 μmol , 3 eq). The mixture was stirred at 50°C under argon overnight. The reaction was quenched with triethylamine (220 μL , 8 eq) and the mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/ PE 20:80) to give **(267a)** as a colorless oil (25mg, 27%) and **(267b)** as a colorless oil (63mg, 66%).

Minor compound (267a)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.46-7.26 (m, 15H; H_{ar}); 6.12 (s, 1H, H-7); 5.17 (s, 2H, CH_2 Cbz); 4.78-4.55 (m, 2H, H-3,4); 4.33 (s, 2H, CH_2 Bn); 4.18-4.00 (m, 1H, H-5); 3.91-3.31 (m, 4H, H-2,6).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 155.9 (C=O); 138.9, 137.7, 136.6, 129.0, 2x128.5, 128.4, 128.0, 127.9, 2x127.8, 127.7, 127.6, 125.9 (C_{ar}); 103.2 (C-7); 75.5, 73.0 (C-3,4); 72.2 (C-5); 71.4 (CH_2Bn); 67.3 (CH_2Cbz); 42.9, 42.5 (C-2,6).

HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 446.1967; found: 446.1960 and calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{NO}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 468.1787; found: 468.1776.

Major compound (**267b**)

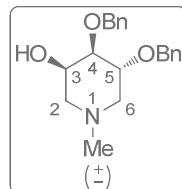
^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.46-7.26 (m, 15H, H_{ar}); 5.83 (s, 1H, H-7); 5.18 (s, 2H, CH_2Cbz); 4.70-4.52 (m, 2H, CH_2Bn); 4.52-4.40 (m, 1H, H-3); 4.40-4.30 (m, 1H, H-4); 4.20-4.10 (m, 1H, H-5); 3.86-3.54 (m, 4H, H-2,6).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 156.1 (C=O Cbz); 137.5, 136.7, 136.0, 129.6, 129.5, 128.5, 128.4, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5, 126.6, 126.5 (C_{ar}); 103.6 (C-7); 74.0, 73.8 (C-3,4); 73.3 (C-5); 71.1 (CH_2Bn); 67.1 (CH_2Cbz); 41.9, 41.1 (C-2,6).

HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 446.1967; found: 446.1963 and calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{NO}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 468.1787; found: 468.1782.

Opening of benzylidene acetal

(3*R**,4*R**,5*R**)-4,5-bis(benzyloxy)-1-methylpiperidin-3-ol (**268a**)

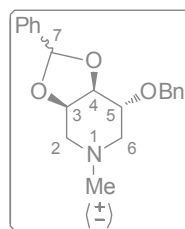


To a solution of (**267b**) (21mg, 0.048mmol, 1 eq) in anhydrous toluene (1.15mL) was added a 1M solution of DIBAL in toluene (0.72mL, 0.72mmol, 15 eq) at 0°C under a nitrogen atmosphere. After 40 minutes of stirring at 0°C, the reaction was quenched with 1M aq. HCl (1mL). The mixture was diluted with water, extracted with CH_2Cl_2 and the combined organic extracts were washed with water. The organic layer was dried over sodium sulfate and evaporated to dryness. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) to give (**268a**) as a colorless oil (11.9mg, 75%) and its isomer 3,5-bis(benzyloxy)-1-methylpiperidin-4-ol (**268b**) (2.3mg, 15%).

^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.38-7.28 (m, 10H, H_{ar}); 4.75-4.62 (m, 4H, 2x CH_2Bn); 4.04 (dt, 1H, H-3, $J_{3-2a}^3 = 5.1\text{Hz}$, $J_{3-4}^3 = J_{3-2b}^3 = 3.0\text{Hz}$); 3.84 (td, 1H, H-5, $J_{5-4}^3 = J_{5-6b}^3 = 7.8\text{Hz}$, $J_{5-6a}^3 = 4.5\text{Hz}$); 3.42 (dd, 1H, H-4, $J_{4-5}^3 = 7.8\text{Hz}$, $J_{4-3}^3 = 3.0\text{Hz}$); 2.95-2.85 (m, 1H, H-6a); 2.85-2.80 (m, 1H, H-2a); 2.42 (bs, 1H, OH), 2.32 (s, 3H, Me); 2.32-2.22 (m, 1H, H-2b); 2.15-2.05 (m, 1H, H-6b).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 138.4, 138.1, 128.5, 128.4, 127.8, 127.8, 127.7, 127.6 (C_{ar}); 80.3 (C-4); 74.9 (C-5); 72.6, 72.4 (2x CH_2Bn); 66.4 (C-3); 58.3 (C-2), 57.3 (C-6); 45.6 (Me).

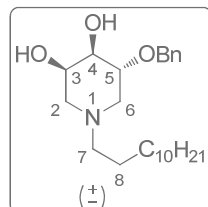
HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 328.1913; found: 328.1913.

(3aR*,7R*,7aS*)-7-(benzyloxy)-5-methyl-2-phenylhexahydro-[1,3]dioxolo[4,5-c]pyridine (269)

To a solution of **(267b)** (19mg, 0.043mmol, 1 eq) in anhydrous toluene (1.00mL) was added a 1M solution of DIBAL in toluene (0.64μL, 0.064mmol, 1.5 eq) at -10°C under a nitrogen atmosphere. After 45 minutes, additional DIBAL (0.64μL, 0.064mmol, 1.5 eq) was added. After 1 hour of stirring at 0°C, the reaction mixture was diluted and quenched with 1M aq. HCl (1mL). The mixture was diluted with water, extracted with CH₂Cl₂ and the combined organic extracts were washed with water. The organic layer was dried over sodium sulfate and evaporated to dryness. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/ PE 70:30) to give **(269)** as a colorless oil (5mg, 0.015mmol, corrected yield 53%) and unreacted product **(267b)** (6mg, 0.013mmol).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7.50-7.27 (m, 10H, H_{ar}); 5.92 (s, 1H, H-7); 4.72 (m, 2H, CH₂ Bn); 4.42-4.32 (m, 1H, H-3); 4.23-4.13 (m, 1H, H-4); 3.87-3.77 (m, 1H, H-5); 3.15-3.00 (m, 1H, H-2a); 2.90-7.75 (m, 1H, H-6a); 2.55-4.40 (m, 1H, H-2b); 2.32 (s, 3H, Me); 2.15-2.00 (m, 1H, H-6b).

HRMS *m/z*: calcd for C₂₀H₂₄NO₃ [M+H]⁺: 326.1759; found: 326.1759.

(3R*,4R*,5R*)-5-(benzyloxy)-1-dodecylpiperidine-3,4-diol (270)

To a solution of **(266)** (40mg, 0.112mmol, 1 eq) in MeOH (2.24mL) was added dodecanal (36μL, 0.162mmol, 1.45 eq), ammonium acetate (0.9mg, 0.011mmol, 0.1 eq) and Pd/C 10% (12mg, 0.112mmol, 1 eq). The mixture was stirred overnight at room temperature under hydrogen atmosphere. Then, the mixture was filtrated over celite and evaporated to dryness. The residue was partitioned between Et₂O and water. The organic extract was washed with water and brine, dried over sodium sulfate and evaporated to dryness. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/NH₃ 99:1) to give **(270)** (43mg, 0.110mmol, 98%) as colorless oil.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7.38-7.28 (m, 5H, H_{ar}); 4.68 (s, 2H, CH₂ Bn); 4.00-3.90 (m, 1H, H-3); 3.65 (td, 1H, H-5, J³₅₋₄ = J³_{5-6a} = 9.0Hz, J³_{5-6a} = 4.5Hz); 3.46 (dd, 1H, H-4, J³₄₋₅ = 9.0Hz, J³₄₋₃ = 3.3Hz); 3.27 (sl, 2H, OH); 3.13-3.03 (m, 1H, H-6a); 3.03-2.93 (m, 1H, H-2a); 2.40 (t, 2H, H-7, J³₇₋₈ = 7.7Hz); 2.25-2.15 (m, 1H, H-2b); 2.00-1.90 (m, 1H, H-6b); 1.55-1.40 (m, 2H, H-8); 1.36-1.20 (m, 18H, H-9 to H-17); 0.88 (t, 3H, H-18, J³₁₇₋₁₈ = 6.9 Hz).

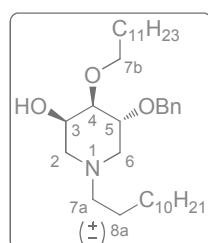
¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 138.4, 128.4, 2x127.7, 127.6 (C_{ar}); 76.9 (C-5); 74.7 (C-4); 72.3 (CH₂Bn); 68.4 (C-3); 57.6 (C-7); 56.8 (C-2); 55.3 (C-6); 31.9, 3x 29.6, 2x 29.5, 29.3, 27.4, 26.7, 22.6 (C-8 to C-17); 14.1 (C-18).

HRMS *m/z*: calcd for C₂₄H₄₂NO₂ [M+H]⁺: 392.3165; found: 392.3159.

Mono-*O*-alkylation

To a solution a suspension of NaH (2.5mg, 0.107mmol, 2.1 eq) in anhydrous THF (0.4mL) at 0°C under argon was added a solution of (**270**) (20mg, 51.1μmol, 1 eq) in anhydrous THF (0.6mL), Bu₄NI (3.8mg, 10.2μmol, 0.2 eq) and 1-bromododecane (12μL, 51.1μmol, 1 eq). The mixture was stirred at reflux under argon. After 2 days of stirring, the mixture was cooled down to room temperature and the reaction was quenched with MeOH. Then the mixture was evaporated to dryness and the residue was dissolved in water, extracted with CH₂Cl₂ and the combined organic extracts were washed with water and brine. The organic layer was dried over sodium sulfate and evaporated to dryness to give a mixture of *O*-alkylated compounds (**271**) (7.0mg, 13μmol), (**272**) (7.1mg, 13μmol) and unreacted starting material (**270**) (8.4mg, 21μmol), corrected yield = 87%, ratio (**271**):(**272**)=1:1. Each isomer was separated by flash chromatography on silica gel (EtOAc/ PE 15:80 to 50:50).

(3*R**,4*R**,5*R**)-5-(benzyloxy)-1-dodecyl-4-(dodecyloxy)piperidin-3-ol (**271**)

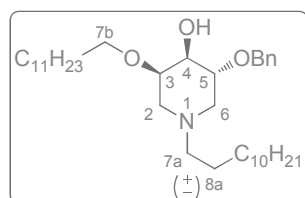


¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7.38-7.27 (m, 5H, H_{ar}); 4.69 (AB, 2H, CH₂ Bn, J²=11.7Hz, Δδ=0.08ppm); 4.10-4.00 (m, 1H, H-3); 3.73 (td, 1H, H-5, J³₅₋₄= J³_{5-6b}= 8.1Hz, J³_{5-6a}= 4.5Hz); 3.67-3.50 (m, 2H, H-7b); 3.22 (dd, 1H, H-4, J³₄₋₅= 8.1Hz, J³₄₋₃= 3.3Hz); 3.00-2.80 (m, 2H, H-6a,2a); 2.36 (t, 2H, H-7a, J³_{7a-8a}= 7.8Hz); 2.25-2.15 (m, 1H, H-2b); 2.10-2.00 (m, 1H, H-6b); 1.70-1.55 (m, 2H, H-8b); 1.50-1.40 (m, 2H, H-8a); 1.40-1.18 (m, 36H, H-9 to H-17); 0.88 (t, 6H, H-18, J³₁₇₋₁₈= 6.9 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 138.8, 128.3, 127.7, 127.5 (C_{ar}); 82.3 (C-4); 75.2 (C-5); 72.8 (CH₂Bn); 70.3 (C-7b); 66.2 (C-3); 57.9 (C-7a); 56.6 (C-2); 55.6 (C-6); 31.9, 30.1, 29.7, 3x 29.6, 2x 29.5, 29.3, 27.5, 26.8, 26.2, 22.7 (C-8 to C-17); 14.1 (C-18).

HRMS *m/z*: calcd for C₃₆H₆₆NO₃ [M+H]⁺: 560.5043; found: 560.5045.

(3*R**,4*R**,5*R**)-3-(benzyloxy)-1-dodecyl-5-(dodecyloxy)piperidin-4-ol (**272**)

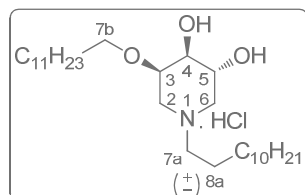


¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 7.38-7.27 (m, 5H, H_{ar}); 4.67 (s, 2H, CH₂ Bn); 3.74-3.64 (m, 3H, H-3,4,5); 3.60-3.37 (m, 2H, H-7b); 2.75-2.65 (m, 2H, H-2a,6a); 2.45-2.35 (m, 2H, H-7a); 2.35-2.25 (m, 2H, H-2b,6b); 1.65-1.50 (m, 4H, H-8a,8b); 1.50-1.15 (m, 36H, H-9 to H-17); 0.88 (t, 6H, H-18, J³₁₇₋₁₈= 6.9 Hz).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 138.6, 128.3, 127.7, 127.6 (C_{ar}); 76.6 (C-5); 75.6 (C-4); 72.0 (CH_2Bn); 71.4 (C-3); 69.6 (C-7b); 58.4 (C-7a); 54.0 (C-2); 52.6 (C-6); 32.8, 31.9, 29.9, 29.7, 3x 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 27.6, 26.6, 26.1, 25.7, 22.7 (C-8 to C-17); 14.1 (C-18).

HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{66}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 560.5043; found: 560.5033.

(3*R,4*S**,5*R**)-1-dodecyl-5-(dodecyloxy)piperidine-3,4-diol (**273**)**



A solution of (**272**) (13mg, 23.2 μmol , 1 eq) and Pd/C 10% (1mg, 11.6 μmol , 0.5 eq) in a mixture of MeOH (0.9mL) and HCl aqueous solution (10%, 0.1mL) was stirred at room temperature for 24 hours under H_2 atmosphere. Then, the mixture was filtrated over celite and the filtrate was evaporated to dryness to give (**273**) (12mg, quantitative) as a yellow oil.

^1H -NMR (CD_3OD , 300 MHz) δ (ppm): 4.05-3.95 (m, 1H, H-3); 3.95-3.80 (m, 1H, H-4); 3.70-3.60 (m, 1H, H-7b); 3.60-3.45 (m, 1H, H-5); 3.35-3.20 (m, 4H, H-2, 6); 3.11 (t, 1H, H-7a, $J^3_{7a-8a} = 7.8\text{Hz}$); 1.65-1.45 (m, 4H, H-8); 1.45-1.15 (m, 36H, H-9 to H-17); 0.88 (t, 6H, H-18, $J^3_{17-18} = 6.9\text{Hz}$).

^{13}C -NMR (CD_3OD , 75 MHz) δ (ppm): 70.8 (C-4); 69.3 (C-5); 65.7 (C-3); 57.1 (C-7a); 51.8, 49.4 (C-2,6); 50.5 (C-7b); 33.1, 2x 30.9, 2x 30.8, 30.7, 30.6, 2x 30.5, 30.2, 27.7, 27.1, 25.1, 23.8 (C-8 to C-17); 14.5 (C-18).

HRMS m/z : calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{60}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 470.4573; found: 470.4562.

Chiral SFC

Solvent used was HPLC grade methanol (MeOH) provided by Carlo Erba Reagents (France). Carbon dioxide was provided by Linde (France).

Samples preparation

1 mg in 1.0 mL of MeOH, the concentration was 1 mg/mL.

Apparatus and operating conditions

The analysis of both enantiomers was carried out using manufactured equipment Waters UPC² PDA SQD. The column was thermostated by an oven regulated at 40°C. A Chiralpak IA column (3 mm silica particles immobilized with amylose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate), 250*4.6 mm, was used with a gradient from 0 to 40% of a MeOH/DEA mixture (99.9:0.1, v/v) as an additive in a CO_2 mobile phase. The flowrate was 1.5 mL/min and the outlet pressure was 130 bar. Injection volumes were 10 μL . UV detection was carried out at 205 nm and mass detection was performed with 3.5kV of capillar voltage and 50kV of cone voltage.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Rosset, I. G.; Burtoloso, A. C. B. Preparation of Z- α,β -Unsaturated Diazoketones from Aldehydes. Application in the Construction of Substituted Dihydropyridin-3-ones. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 9464-9470.
2. Ando, K. Convenient Preparations of (Diphenylphosphono)acetic Acid Esters and the Comparison of the Z-Selectivities of Their Horner–Wadsworth–Emmons Reaction with Aldehydes Depending on the Ester Moiety. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8406-8408.
3. Ando, K. Practical synthesis of Z-unsaturated esters by using a new Horner–Emmons reagent, ethyl diphenylphosphonoacetate. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4105-4108.
4. De Cola, C.; Manicardi, A.; Corradini, R.; Izzo, I.; De Riccardis, F. Carboxyalkyl peptoid PNAs: synthesis and hybridization properties. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 499-506.
5. Frigerio, M.; Santagostino, M.; Sputore, S. A User-Friendly Entry to 2-Iodoxybenzoic Acid (IBX). *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4537-4538.
6. Still, W. C.; Gennari, C. Direct synthesis of Z-unsaturated esters. A useful modification of the horner–emmons olefination. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 4405-4408.
7. Ando, K. Highly Selective Synthesis of Z-Unsaturated Esters by Using New Horner–Emmons Reagents, Ethyl (Diarylphosphono)acetates. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1934-1939.
8. Ando, K. Z-Selective Horner–Wadsworth–Emmons Reaction of α -Substituted Ethyl (Diarylphosphono)acetates with Aldehydes. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8411-8416.
9. Ando, K. A Mechanistic Study of the Horner–Wadsworth–Emmons Reaction: Computational Investigation on the Reaction Pass and the Stereochemistry in the Reaction of Lithium Enolate Derived from Trimethyl Phosphonoacetate with Acetaldehyde. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6815-6821.
10. Wang, J.; Hou, Y.; Wu, P. Intramolecular N-H insertion of α -diazocarbonyls catalyzed by Cu(acac)₂: An efficient route to derivatives of 3-oxoazetidines, 3-oxopyrrolidines and 3-oxopiperidines. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 2277-2280.
11. VanRheenen, V.; Kelly, R. C.; Cha, D. Y. An improved catalytic OsO₄ oxidation of olefins to cis-1,2-glycols using tertiary amine oxides as the oxidant. *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17*, 1973-1976.
12. Castillo, J. A.; Calveras, J.; Casas, J.; Mitjans, M.; Vinardell, M. P.; Parella, T.; Inoue, T.; Sprenger, G. A.; Joglar, J.; Clapés, P. Fructose-6-phosphate Aldolase in Organic Synthesis: Preparation of d-Fagomine, N-Alkylated Derivatives, and Preliminary Biological Assays. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 6067-6070.
13. Ley, S. V.; Boons, G.-J.; Leslie, R.; Woods, M.; Hollinshead, D. M. Dispiroketal in Synthesis (Part 3): Selective Protection of Diequatorial Vicinal Diols in Carbohydrates. *Synthesis* **1993**, 689-692.
14. Ley, S. V.; Leslie, R.; D. Tiffin, P.; Woods, M. Dispiroketal in synthesis (part 2): A new group for the selective protection of diequatorial vicinal diols in carbohydrates. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4767-4770.
15. Ley, S. V.; Woods, M.; Zanotti-Gerosa, A. Dispiroketal in Synthesis: Preparation of a Stable, Sterically Demanding Glyceraldehyde Ketal and Diastereoselective Reactions with Simple Organometallic Reagents. *Synthesis* **1992**, 52-54.
16. Ley, S. V.; Priepke, H. W. M.; Warrine, S. L. Cyclohexane-1,2-diacetals (CDA): A New Protecting Group for Vicinal Diols in Carbohydrates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 2290-2292.

17. Grice, P.; V. Ley, S.; Pietruszka, J.; W. M. Priepeke, H.; L. Warriner, S. Preparation, structure, derivatisation and NMR data of cyclohexane-1,2-diacetal protected carbohydrates. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 351-364.
18. Montchamp, J.-L.; Tian, F.; Hart, M. E.; Frost, J. W. Butane 2,3-Bisacetal Protection of Vicinal Diequatorial Diols. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 3897-3899.
19. Hense, A.; V. Ley, S.; M. I. Osborn, H.; R. Owen, D.; Poisson, J.-F.; L. Warriner, S.; E. Wesson, K. Direct preparation of diacetals from 1,2-diketones and their use as 1,2-diol protecting groups. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 2023-2032.
20. Dokli, I.; Navarini, L.; Hameršak, Z. Syntheses of 3-, 4-, and 5-*O*-feruloylquinic acids. *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, 24, 785-790.
21. Martín, R.; Murruzzu, C.; Pericàs, M. A.; Riera, A. General Approach to Glycosidase Inhibitors. Enantioselective Synthesis of Deoxymannojirimycin and Swainsonine. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 2325-2328.
22. Jagadeesh, Y.; Tran, A. T.; Luo, B.; Auberger, N.; Desire, J.; Nakagawa, S.; Kato, A.; Zhang, Y.; Sollogoub, M.; Bleriot, Y. γ -Aminoalcohol rearrangement applied to pentahydroxylated azepanes provides pyrrolidines epimeric to homoDMDP. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 3446-3456.
23. Liotta, L. J.; Chalmers, J. F.; Falco Marshall, J. N.; Ferreira, T. E.; Mullen, H. E.; Pace, N. J. Selective 4,6-*O*-benzylidene formation of methyl α -D-mannopyranoside using 2,6-dimethylbenzaldehyde. *Carbohydr. Res.* **2014**, 391, 31-36.
24. Maity, S. K.; Patra, A.; Ghosh, R. Convergent synthesis of the tetrasaccharide repeating unit related to the *O*-antigenic polysaccharide of Escherichia coli 78. *Tetrahedron* **2010**, 66, 2809-2814.
25. Tanaka, N.; Ogawa, I.; Yoshigase, S.; Nokami, J. Regioselective ring opening of benzylidene acetal protecting group(s) of hexopyranoside derivatives by DIBAL-H. *Carbohydr. Res.* **2008**, 343, 2675-2679.
26. Koch, S.; Schollmeyer, D.; Löwe, H. C-Glycosyl Amino Acids through Hydroboration-Cross-Coupling of exo-Glycals and their application in automated Solid-Phase Synthesis. *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 7020-7041.
27. Rujirawanich, J.; Kongkathip, B.; Kongkathip, N. Regioselective ring opening of exo- and endo-3,4-benzylidene acetals of arabinopyranoside derivatives with Lewis acids and reducing agents. *Carbohydr. Res.* **2011**, 346, 927-932.
28. Szikra, D.; Mándi, A.; Borbás, A.; Nagy, I. P.; Komáromi, I.; Kiss-Szikszai, A.; Herczeg, M.; Antus, S. A kinetic study on the reductive opening of the diphenylmethylene acetal in methyl 2,3-*O*-diphenylmethylene- α -L-rhamnopyranoside. *Carbohydr. Res.* **2011**, 346, 2004-2006.
29. Oikawa, M.; Liu, W.-C.; Nakai, Y.; Koshida, S.; Fukase, K.; Kusumoto, S. Regioselective Reductive Opening of 4,6-*O*-Benzylidene Acetals of Glucose or Glucosamine Derivatives by $\text{BH}_3\cdot\text{Me}_2\text{NH} - \text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$. *Synlett* **1996**, 1179-1180.
30. Jayaraman, M.; Ansell, S. M.; Mui, B. L.; Tam, Y. K.; Chen, J.; Du, X.; Butler, D.; Eltepu, L.; Matsuda, S.; Narayanannair, J. K.; Rajeev, K. G.; Hafez, I. M.; Akinc, A.; Maier, M. A.; Tracy, M. A.; Cullis, P. R.; Madden, T. D.; Manoharan, M.; Hope, M. J. Maximizing the Potency of siRNA Lipid Nanoparticles for Hepatic Gene Silencing In Vivo. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 8529-8533.
31. Sajiki, H. Selective inhibition of benzyl ether hydrogenolysis with Pd/C due to the presence of ammonia, pyridine or ammonium acetate. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 3465-3468.
32. Boucheron, C.; Desvergnès, V.; Compain, P.; Martin, O. R.; Lavi, A.; Mackeen, M.; Wormald, M.; Dwek, R.; Butters, T. D. Design and synthesis of iminosugar-based inhibitors of glucosylceramide

synthase: the search for new therapeutic agents against Gaucher disease. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16, 1747-1756.

33. Oulaïdi, F.; Front-Deschamps, S.; Gallienne, E.; Lesellier, E.; Ikeda, K.; Asano, N.; Compain, P.; Martin, O. R. Second-Generation Iminoxyitol-Based Pharmacological Chaperones for the Treatment of Gaucher Disease. *ChemMedChem* **2011**, 6, 353-361.

34. Li, H.; Schutz, C.; Favre, S.; Zhang, Y.; Vogel, P.; Sinay, P.; Bleriot, Y. Nucleophilic opening of epoxyazepanes: expanding the family of polyhydroxyazepane-based glycosidase inhibitors. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 1653-1662.

35. Lombardo, M.; Gianotti, K.; Licciulli, S.; Trombini, C. An environmentally friendly α -hydroxyallylation reaction of the Garner aldehyde: a comparative assessment of alternative Barbier conditions. *Tetrahedron* **2004**, 60, 11725-11732.

36. Andersch, J.; Bols, M. Efficient Synthesis of Isofagomine and Noeuromycin. *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 3744-3747.

37. Tsuda, Y.; Hanajima, M.; Yoshimoto, K. Regioselective oxidation of beta-L-arabinopyranoside via cyclic tin intermediate. Facile synthesis of 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, an amino-sugar found in lipopolysaccharides of some salmonelle R mutant strains. *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, 31, 3778-3780.

38. Kung, C.-H.; Kwon, C.-H. Carbamate derivatives of felbamate as potential anticonvulsant agents. *Med. Chem. Res.* **2010**, 19, 498-513.

Conclusion générale

Conclusion générale

L'objectif de ces travaux de thèse était d'identifier de nouveaux inhibiteurs potentiels du transport de céramide par CERT en tant qu'agents de resensibilisation de lignées de cellules cancéreuses chimiorésistantes.

A partir des structures cristallographiques du domaine START de CERT, sous sa forme *apo* ou co-cristallisée avec différents ligands, nous avons tout d'abord développé une méthode d'arrimage moléculaire. Après validation qualitative de ce filtre *in silico* par la reproduction des poses cristallographiques des céramides, HPAs et diacylglycérol, ainsi que la corrélation des résultats de modélisation avec ceux du test FLINT de liaison spécifique *in vitro*, cette méthodologie a été appliquée pour cribler *in silico* une ligandothèque focalisée.

En parallèle, un test *in vitro* HTR-FRET a été développé en collaboration avec les Drs. Laurence Fleury et Frédéric Ausseil, afin d'identifier de nouveaux ligands de la protéine, potentiellement antagonistes de CERT. Ce test inédit sur cette protéine a notamment permis de cribler la Chimiothèque Nationale Essentielle.

Dans un second temps, une conception rationnelle de nouveaux ligands du domaine START de CERT a été réalisée. Cette conception s'est appuyée sur l'optimisation des HPAs en collaboration avec les Pr. Adam Daïch et Dr. Dušan Berkeš. Cette étude a permis de faire ressortir des tendances de relations structure-activité sur cette famille de composés. La modélisation a aussi permis d'élaborer des iminosucres alkylés, mimes du céramide dans sa conformation cristallisée dans le domaine START en collaboration avec le Pr. Philippe Compain.

Cette étude de modélisation moléculaire, combinant des approches de criblage et de conception rationnelle, a ainsi permis d'identifier trois nouvelles familles de ligands de la protéine CERT : la jaspine B et ses analogues, les HPAs à deux chaînes lipidiques ainsi que des iminosucres polyhydroxylés de type azépane ou pipéridine.

L'obtention de structures par cristallographie aux rayons X du domaine START co-cristallisé avec ces composés permettrait de valider les conformations calculées de ces complexes et confirmer les hypothèses de ce travail.

Nous avons ensuite développé une nouvelle voie de synthèse en série racémique de la jaspine B, en 6 étapes à partir de la D-érythronolactone, avec un rendement global de 7%. Les étapes clés de cette synthèse sont l'ouverture régiosélective de l'aziridine (**213**) et la cyclisation intramoléculaire successive, puis l'oléfination de Julia entre l'oxazolidinone lactone (**214**) et la sulfone (**215**).

Nous avons aussi synthétisé des sondes dérivées de la jaspine B à partir des intermédiaires oxazolidinone vinylique (**210**) et oxazolidinone lactone (**214**) précédemment développés au laboratoire. Les sondes jaspine B-BODIPY (**230**) et jaspine B-streptocyanine (**249**) ont été utilisées pour réaliser des expériences d'imagerie cellulaire par microscopie de fluorescence. Ces essais préliminaires ont mis en évidence une internalisation de ces sondes dans les cellules HCT116 et une localisation périnucléaire en accord avec une potentielle inhibition de la CERT.

Par la suite, ces sondes pourront être co-localisées dans la cellule avec des marqueurs du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi afin d'approfondir la connaissance du mode d'action de la jaspine B.

Enfin, deux des iminosucres identifiés comme ligands du domaine START de CERT au cours de l'étude de modélisation moléculaire ont été synthétisés en série racémique. Les synthèses de L127 et L125 ont été réalisées en collaboration avec le Pr. Antonio Burtoloso. Elles s'appuient sur une oléfinatation d'Horner-Wadworth-Emmons entre l'aldéhyde (**253**) et le diazophosphonate (**251**), puis une réaction d'insertion NH. Ainsi, les composés L127 et L125 ont été obtenus respectivement en 7 et 10 étapes à partir de l'éthanolamine, avec des rendements globaux respectifs de 10% et 9%.

La synthèse des iminosucres L046, L060, L124 et L141, ligands potentiels de la protéine, sera intéressante à réaliser afin d'évaluer leur liaison avec le domaine START de CERT et contrôler et la qualité prédictive du modèle *in silico* et l'optimiser.

TITLE: Conception, synthesis and evaluation of novel CERT mediated ceramide transport inhibitors, towards new sensitizing agents of chemoresistant cancer cells.

ABSTRACT

During its metabolism, ceramides, produced *de novo* in the endoplasmic reticulum, are transported to the Golgi complex to be converted into sphingomyelin. The main way of this transport involves the cytosolic CERT protein (Ceramide Transfer).

Overexpression of CERT, responsible for a diminution of intracellular level of proapoptotic ceramide, is associated with the phenomenon of resistance to chemotherapeutic agents in several tumor cell lines. The CERT inhibition allows to resensitize these cell lines to anticancer drugs. Yet, only a single family of inhibitors is known to date: HPAs.

Located at the C-terminal region of the protein, the START domain contains the binding site of ceramide necessary for the transport activity of CERT. Based on crystallographic structures, a method for the identification of new CERT ligands, combining *in silico* and *in vitro* tools, was developed. Jaspine B, HPAs analogs and iminosugars were identified as potential antagonists using this method. Some of these compounds were synthesized and evaluated *in vitro*. Fluorescent probes of jaspine B were designed for a better understanding of its mechanism of action. In parallel, an *in vitro* HTR-FRET binding assay was developed, allowing the high-throughput screening of the National Essential Compound Library.

AUTEUR : SANTOS Cécile

TITRE : Conception, synthèse et évaluation de nouveaux inhibiteurs du transport de céramide : vers de nouveaux agents de sensibilisation des cellules cancéreuses chimiorésistantes

DIRECTEURS DE THESE : GENISSON Yves / BALLEREAU Stéphanie

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Toulouse, le 30 novembre 2015

RESUME

Au cours de leur métabolisme, les céramides, produits *de novo* au niveau du réticulum endoplasmique, sont transportés vers l'appareil de Golgi pour être convertis en sphingomyéline. Le mode principal de ce transport implique la protéine cytosolique CERT (CERamide Transfer).

La surexpression de CERT, responsable d'un abaissement du taux intracellulaire en céramide pro-apoptotique, a été associée au phénomène de résistance aux agents chimiothérapeutiques de plusieurs lignées de cellules tumorales. L'inhibition de CERT permet de resensibiliser ces lignées cellulaires aux agents anti-cancéreux. Cependant, une seule famille d'inhibiteurs de CERT est connue à ce jour : les HPAs.

A l'extrémité C-terminale de la protéine, le domaine START contient le site de liaison du céramide nécessaire à l'activité de transport de CERT. A partir de structures cristallographiques, une méthode d'identification de nouveaux ligands, combinant des outils *in silico* et *in vitro*, a été développée. La jaspine B, des analogues HPAs et des iminosucres ont été mis à jour en tant qu'antagonistes potentiels de CERT par cette méthode. Certains des composés identifiés ont été synthétisés et évalués *in vitro*. Des sondes fluorescentes de la jaspine B ont été conçues afin d'approfondir la compréhension de son mécanisme d'inhibition. En parallèle, un test de liaison *in vitro* HTR-FRET a été développé, permettant le criblage haut-débit de la Chimiothèque Nationale Essentielle.

MOTS-CLES : protéine CERT, céramide, cancer, arrimage moléculaire, jaspine B, iminosucres

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Chimie – Biologie – Santé

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie des Molécules d'Intérêt Biologique,
UMR 5068, Université Paul Sabatier/CNRS
118 route de Narbonne
31062 Toulouse Cedex